

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO  
PAULO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR  
E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**GENOMAS DOS FUNGOS *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma camerunense* E A  
INTERAÇÃO NA CULTURA DO TOMATEIRO E COM FITOPATÓGENOS**

**CARLOS ALBERTO ALBUQUERQUE DE MEDEIROS**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio. Área de  
concentração: Segurança alimentar e sanidade  
no agroecossistema.

SÃO PAULO

2022

**CARLOS ALBERTO ALBUQUERQUE DE MEDEIROS**

**GENOMAS DOS FUNGOS *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma camerunense* E A  
INTERAÇÃO NA CULTURA DO TOMATEIRO E COM FITOPATÓGENOS**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança alimentar e  
sanidade no agroecossistema.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Harakava

SÃO PAULO

2022

Eu **Carlos Alberto Albuquerque de Medeiros**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Carlos Albuquerque Data 19 /01 /2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Medeiros, Carlos Alberto Albuquerque de.

Genomas dos fungos *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma camerunense* e a interação na cultura do tomateiro e com fitopatógenos. / Carlos Alberto Albuquerque de Medeiros. - São Paulo, 2022.

91 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2022T.CM005

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Fungi genomes *Trichoderma lentiforme* and *Trichoderma camerunense* and the interaction in tomato crop and with phytopathogens

1. Sequenciamento de DNA 2. Controle biológico 3. MinION 4. indução de resistência 5. *Solanum lycopersicum* I. Medeiros, Carlos Alberto de Medeiros II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

*IB/Bibl./2022/005*

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Carlos Alberto Albuquerque de Medeiros

Título: Genomas dos fungos *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma camerunense* e análise da expressão gênica de tomateiro durante a interação com esses fungos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

A todos os professores e professoras que contribuíram para a minha educação.

A minha querida avó, Maria Luzinete (*in memoriam*), OFEREÇO.

## AGRADECIMENTOS

Obrigado ao meu orientador Ricardo Harakava, por toda paciência, educação e contribuição para a minha formação como Doutor. Agradeço aos meus colegas e amigos do grupo de pesquisa em *Trichoderma* e biologia molecular: Patrícia Haddad, Amanda Oliveira, Samuel La Marck, Maria Júlia Cambuhy e Keila Santos. Aos meus colegas de laboratório: Juliana Astúa, Pedro Gonzales, Mariane Rodrigues, Matheus Potsclam, Isabela Leão, Gustavo Santos, Camila Chabi, Thais Sínico, Giovanni Martinelli, Thaína Nassau e Uiara Souza, muito obrigado por também contribuir todos os dias na minha rotina de trabalho! A pós-graduação do Instituto Biológico coordenada pelo prof. Marcelo Eiras, aos professores: Renata Sampaio, Luciana Garcia e Mario Sato, em especial, obrigado pelas contribuições na construção deste trabalho e por todo acolhimento. Aos colegas de pós-graduação: Elisa Miyasato e Luara Cassiano, obrigado por toda ajuda e companheirismo durante todos esses anos. As funcionárias do Instituto Biológico Solange e Samira, que desempenham um papel tão necessário para o acolhimento dos alunos, obrigado! Agradeço o apoio emocional e incondicional da minha família, Jaqueline Medeiros, Jackson Medeiros, João Medeiros, Pedro Medeiros e Sophia Medeiros, e dos amigos: Cesar Santos, Douglas Santos, Júlio Mattos, Samuel Medeiros, Kleyce Abreu e Sara Bezerra. Agradeço o presente trabalho que foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001, durante 14 meses. Também a fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos do projeto de Auxílio Regular à Pesquisa (proc.2019/08627-9), coordenado pelo Dr. Ricardo Harakava, que permitiu a realização deste trabalho durante o tempo restante.

“O ideal é ainda a alma de todas as realizações.”

(Getúlio Vargas, fevereiro de 1931)

## RESUMO

MEDEIROS, Carlos Alberto Albuquerque. **Genomas dos fungos *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma camerunense* e a interação na cultura do tomateiro e com fitopatógenos.** 2022. 91 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2022.

Fungos do gênero *Trichoderma* têm se destacado como agentes de controle biológico devido aos diversos mecanismos de ação como também pela relação simbiótica que mantêm com as espécies vegetais. Há um aprofundamento no estudo de sua biologia e de seu manejo agrícola, havendo ainda uma demanda de conhecimentos genômicos e taxonômicos deste fungo. Desta forma, foi proposto a obtenção dos genomas completos dos isolado 30/07 (*T. lentiforme*) e 19/17 (*T. camerunense*) e a verificação do efeito da inoculação destes fungos em tomateiros, em diferentes condições de plantio, quanto a promoção de crescimento e a interação com fitopatógenos. Foram utilizados dois substratos (Tropstrato e Vivatto) com diferentes efeitos nas plantas. A partir destas condições de plantio e após inoculação com *Trichoderma*, foram analisados os seguintes parâmetros em tomateiro: emergência das mudas e crescimento das plantas e indução da resistência contra doenças causadas por *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*. Para a eficácia do sequenciamento, foram testados 3 métodos de extração de DNA: CTAB-brometo de cetiltrimetilamônio, DNeasy Plant Mini kit -QIAGEN e Wizard Genomic DNA Purification kit-PROMEGA. A obtenção dos genomas completos dos isolados foi realizada por meio da tecnologia Oxford Nanopore -MinION (sequências longas) e a plataforma NextSeq-Illumina. Os resultados dos ensaios de promoção de crescimento demonstraram que as condições de plantio podem influenciar diretamente no efeito do *Trichoderma* nas plantas, podendo ser positivo ou negativo. O tratamento prévio do *Trichoderma* nas plantas de tomateiro não foi eficaz contra a fusariose, mas teve um efeito redutor contra o mofo cinzento. O antagonista também não causou um efeito positivo na emergência das mudas. O método CTAB foi o mais eficiente na extração do DNA dos isolados de *Trichoderma*, mantendo maior concentração e preservando a molécula. O sequenciamento híbrido com as duas plataformas foi eficiente na obtenção dos genomas completos, que apresentaram tamanhos e conteúdos gênicos semelhantes aos de outras espécies do mesmo gênero já sequenciadas.

**Palavras-chave:** Sequenciamento de DNA, controle biológico, MinION, indução de resistência, *Solanum lycopersicum*.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Carlos Alberto Albuquerque. **Fungi genomes *Trichoderma lentiforme* and *Trichoderma camerunense* and the interaction in tomato crop and with phytopathogens.** 2022. 91 p. Thesis (Doctorate of Animal, Plant Health and Food Safety in Agribusiness) – Biological Institute, APTA, SAA, São Paulo, 2022.

Fungi of the genus *Trichoderma* have been highlighted as biological control agents due to the different mechanisms of action as well as the symbiotic relationship they maintain with plant species. There is an in-depth study of its biology and agricultural management, and there is still a demand for genomic and taxonomic knowledge of this fungus. Thus, it was proposed to obtain the complete genomes of isolates 30/07 (*T. lentiforme*) and 19/17 (*T. camerunense*) and to verify the effect of inoculation of these fungi in tomato plants, under different planting conditions, regarding the promotion of growth and interaction with phytopathogens. Two substrates (Tropstrato and Vivatto) were used with different effects on plants. From these planting conditions and after inoculation with *Trichoderma*, the following parameters were analyzed in tomato: seedling emergence and plant growth and induction of resistance against diseases caused by *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. For sequencing efficiency, 3 DNA extraction methods were tested: CTAB-cetyltrimethylammonium bromide, DNeasy Plant Mini kit -QIAGEN and Wizard Genomic DNA Purification kit-PROMEGA. The complete genomes of the isolates were obtained using the Oxford Nanopore -MinION technology (long sequences) and the NextSeq-Illumina platform. The results of the growth promotion tests showed that the planting conditions can directly influence the effect of *Trichoderma* on plants, which can be positive or negative. Pretreatment of *Trichoderma* on tomato plants was not effective against fusariosis, but had a reducing effect against gray mold. The antagonist also did not cause a positive effect on seedling emergence. The CTAB method was the most efficient in extracting DNA from *Trichoderma* isolates, maintaining the highest concentration and preserving the molecule. Hybrid sequencing with the two platforms was efficient in obtaining complete genomes, which presented similar sizes and gene contents to other species of the same genus already sequenced.

**Keywords:** DNA Sequencing, Biological Control, MinION, Resistance Induction, *Solanum lycopersicum*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	12
2. OBJETIVOS .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 RELAÇÕES SIMBIÓTICAS ENTRE MICRORGANISMOS E PLANTAS.....	14
3.2 O GÊNERO <i>Trichoderma</i> .....	16
3.2.1 GÊNOMICA DE <i>Trichoderma</i> .....	20
3.2.2 COLEÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Trichoderma</i> DA UNIDADE LABORATORIAL DE REFERÊNCIA EM BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA DO INSTITUTO BIOLÓGICO - ULRBMA .....	24
3.3 TECNOLOGIA DE SEQUÊNCIAMENTO DE DNA .....	25
4. INTRODUÇÃO .....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
5.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS .....	30
5.2 SUBSTRATOS COMERCIAIS .....	30
5.3 ENSAIOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO.....	31
5.3.1 AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp. VIA IRRIGAÇÃO E ARROZ COLONIZADO .....	31
5.3.2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO POR <i>Trichoderma</i> spp UTILIZANDO O SUBSTRATO COMERCIAL VIVATTO, COLONIZAÇÃO DE RAÍZES E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR <i>Botrytis cinerea</i> .....	32
5.3.3 AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO COM <i>Trichoderma</i> spp. UTILIZANDO COMBINAÇÃO DOS SUBSTRATOS TROPSTRATO E VIVATTO EM DIFERENTES PROPORÇÕES.....	33
5.3.4 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp NA EMERGÊNCIA DE MUDAS DE TOMATEIRO CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS .....	33
5.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	34
5.4.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE TOMATEIRO, TRATADAS COM <i>Trichoderma</i> spp. E CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS CONTRA A INFECÇÃO DE <i>Fusarium oxysporum</i> . .....	34
5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	36
6. RESULTADOS .....	36
6.1 ENSAIOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO.....	36
6.1.1 AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp. VIA IRRIGAÇÃO E ARROZ COLONIZADO .....	36
6.1.2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO POR <i>Trichoderma</i> spp UTILIZANDO O SUBSTRATO COMERCIAL VIVATTO, COLONIZAÇÃO DE RAÍZES E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR <i>Botrytis cinerea</i> .....	38

6.1.3 AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO COM <i>Trichoderma</i> spp. UTILIZANDO COMBINAÇÃO DOS SUBSTRATOS TROPSTRATO E VIVATTO EM DIFERENTES PROPORÇÕES.....	40
6.1.4 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE <i>Trichoderma</i> spp NA EMERGÊNCIA DE MUDAS DE TOMATEIRO CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS .....	42
6.2 ENSAIO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	46
6.2.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE TOMATEIRO, TRATADAS COM <i>Trichoderma</i> spp. E CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS CONTRA A INFECÇÃO DE <i>Fusarium oxysporum</i> .....	46
7. DISCUSSÃO.....	47
8. CONCLUSÕES.....	53
CAPÍTULO 2 – SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS DE <i>Trichoderma camerunense</i> (IB 30/07) E <i>Trichoderma lentiforme</i> (IB 19/17) UTILIZANDO A TECNOLOGIA NANOPORE E A PLATAFORMA NEXTSEQ.....	54
9. INTRODUÇÃO .....	54
10. MATERIAL E METODOS.....	55
10.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	55
10.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PELO METODO CTAB MODIFICADO.....	55
10.3 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DOS GENOMAS.....	56
11. RESULTADOS.....	58
11.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	58
11.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS .....	60
12 DISCUSSÃO .....	71
12 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A palavra sustentabilidade é um dos termos que mais aparecem em notícias, artigos científicos e redes sociais nas últimas duas décadas. Este termo está associado a diversos setores, como construção civil, gestão ambiental, marketing, e principalmente no setor agrícola. A sustentabilidade necessita gerar desenvolvimento e no setor agrícola isso é explorado principalmente na agricultura familiar, na geração de renda e desenvolvimento de uma determinada região, sempre em consórcio com boas práticas agrícolas que preservem o meio ambiente e a saúde humana (EXIME *et al.*, 2021).

O controle biológico de doenças de plantas – CBDP é uma ferramenta dentre muitas, que pode ser explorada para o planejamento sustentável da prática agrícola. Esse trabalho envolve a contribuição de diversos profissionais, deste aquele que está desenvolvendo o pequeno agricultor no campo, transmitindo informações e realizando a extensão rural, até o que realiza a pesquisa e desenvolve novas tecnologias para a sociedade. De acordo com o Censo Agropecuário de 2017, 77% dos estabelecimentos agrícolas do país são classificados como pertencente à agricultura familiar (IBGE, 2019). Desta forma, o papel da ciência está aliado diretamente ao aspecto social, à manutenção e melhoria do trabalho de milhares de famílias que estão ligadas à produção de alimentos.

As inovações tecnológicas são importantes para a evolução das ferramentas utilizadas no manejo agrícola. Quando se trata de CBDP, a rastreabilidade de agentes microbianos de elite é essencial para sua eficácia. Para isso, é necessário a exploração de diversos biomas e regiões onde podem ser encontrados estes microrganismos em diversidade. Posteriormente, outro passo importante é a testagem e experimentação dos métodos, para que se conheça características biológicas e possíveis modos de ação destes agentes. O gênero de fungos *Trichoderma* é um dos principais representantes no grupo destes microrganismos. Atualmente é possível encontrar informações sobre a biologia deste fungo, bem como sua interação com diversas culturas. Também é possível adquirir produtos biológicos registrados tendo como princípio ativo o *Trichoderma* (BETTIOL *et al.*, 2019).

Devido à grande diversidade de espécies de *Trichoderma*, um estudo mais aprofundado sobre sua genômica aliado à sua interação com as plantas é ainda necessário. As ferramentas de biologia molecular têm suportado este aspecto, principalmente o sequenciamento de nova geração – NGS, que permitiram o sequenciamento em larga escala e o registro das informações genéticas em domínio público, como o NCBI (National Center

for Biotechnology Information). Assim, este estudo propôs o sequenciamento dos genomas completos de duas espécies de *Trichoderma* (*T. camerunense*) e (*T. lentiforme*), ambos com bom desempenho no CBDP. Também se realizou o estudo da interação destes isolados com plantas de tomateiro em diferentes situações de plantio e em diferentes patossistemas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito dos isolados IB 30/07 (*T. lentiforme*) e IB 19/17 (*T. camerunense*) na promoção de emergência e crescimento de plantas de tomate, na indução de resistência contra o mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) e murcha de *Fusarium* (*F. oxysporum*) e obter genomas completos destes isolados.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Testar a interação dos isolados de *Trichoderma* (*T. lentiforme* – IB 30/07 e *T. camerunense* – IB 19/17) com plantas de tomateiro em diferentes condições de plantio quanto a promoção de crescimento e na indução de resistência contra *B. cinerea* e *F. oxysporum*;
- Sequenciar os genomas dos isolados IB 30/07 e IB 19/17 empregando estratégia híbrida com sequências ultra-longas (MinION, Oxford Nanopore) e sequências curtas de alta qualidade (MiSeq, Illumina);
- Realizar a montagem e anotação dos genomas obtidos neste estudo e comparar os genes resultantes com as características biológicas já testadas anteriormente para os isolados;

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 RELAÇÕES SIMBIÓTICAS ENTRE MICRORGANISMOS E PLANTAS

A interação entre plantas e microrganismos ocorre principalmente no contato das raízes com o solo. Nas plantas, o sistema radicular é considerado uma das principais ferramentas que tem como função a ancoragem, absorção de água e nutrientes e a simbiose com outros organismos (HETHERINGTON e DOLAN, 2018). É difícil estimar a quantidade da biomassa microbiana no solo, já que a maioria das células não pode ser cultivada, mas estima-se que a quantidade de organismos que são cultiváveis representa menos de 5% do total (BORNEMAN e TRIPLETT, 1997; GARBEVA, VAN VEEN e VAN ELSAS, 2004). Todavia, nesta mesma comunidade também estão presentes os fitopatógenos, de tal forma que as plantas necessitam identificar quais são os microrganismos que podem fazer interação sem causar danos ao seu sistema. Para fazer essa distinção, as plantas utilizam de um mecanismo singular ativado pelo sistema radicular, o qual reconhece e filtra os microrganismos com os quais desenvolverá uma relação simbiótica. Esse processo é mediado por sinais como os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou outros sinais simbióticos (ZIPFEL e OLDROYD, 2017). É importante salientar que os fitopatógenos utilizam de estratégias para conseguir se estabelecer no hospedeiro, vencendo os mecanismos de detecção e defesa das plantas (MICHEREFF, 2005) e isso varia de acordo com a evolução destes organismos.

Manter-se próximo às plantas em sua rizosfera acarreta benefícios a muitos microrganismos. Isso se reflete em uma estabilidade para a comunidade microbiana, já que há disponível neste ambiente substratos orgânicos que favorecem o crescimento e o desenvolvimento rápido (DANTAS, SOUZA e NOGUEIRA, 1984). Em contrapartida, as plantas também se beneficiam desta presença realizando ciclagem de nutrientes, degradando substâncias tóxicas, promovendo crescimento, contribuindo para a agregação e estruturação do solo, realizando o controle de doenças e pragas e aumentando a resistência a intempéries abióticas (BARBOSA *et al.*, 2014). Entretanto, as relações simbióticas entre o microrganismo e a planta não se resumem somente a esses fatores, podendo ser mais específicas, e a depender do microrganismo, planta e ambiente em que eles se encontram.

Uma das relações simbióticas mais antigas é entre as plantas e os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), que ocorrem no córtex das raízes, através da penetração inter e intracelulares das hifas destes fungos, formando arbúsculos e vesículas. Estes simbiontes

estimulam o crescimento das plantas e aumentam a absorção de fósforo, zinco e cobre (ANTONIOLLI e KAMINSKI, 1992).

As bactérias são outro componente importante da comunidade microbiana que mantém relação simbiótica com as plantas utilizando a rizosfera. São diversas as espécies encontradas no solo, sendo *Bacillus* um exemplo de gênero de bactéria que se destaca nessas relações. Diversas espécies deste gênero atuam como agentes de controle biológico com grande potencial de uso agrícola, devido à sua capacidade de promover crescimento, disponibilizar nutrientes, garantir proteção contra patógenos e doenças abióticas (LANNA-FILHO, FERRO e PINHO, 2010). Inúmeros trabalhos envolvendo esse gênero de bactérias foram realizados na última década e graças as técnicas de biologia molecular foi possível associar diferentes espécies de *Bacillus* a diversos benefícios em importantes culturas agrícolas (BHATTACHARYA e JHA, 2012; DORIGHELLO *et al.*, 2015; HAHNE *et al.*, 2010; HOFFMAN *et al.*, 2002; JANTO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2015; KITADA *et al.*, 1994; XIONG *et al.*, 2015).

Dentre bactérias da família Rhizobiaceae, encontram-se os rizóbios que mantêm relação simbiótica com as plantas, e são fixadoras de nitrogênio (N), através de estruturas chamadas nódulos (SOARES *et al.*, 2006). Os rizóbios são conhecidos por colonizarem as raízes das plantas leguminosas (JANET e SPRENT, 2016), aumentando a produção, como pode ser observado em produções de soja (ZILLI, CAMPO e HUNGRIA, 2010) e feijão (SILVA *et al.*, 2019).

O grupo de bactérias fixadoras de N nas plantas vai além dos rizóbios, destacando-se também as betaproteobactérias e as actinobactérias. Dentre as betaproteobactérias, o gênero *Burkholderia* spp. está associado a nódulos presentes nas raízes de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e café (*Coffea arabica*). Os benefícios da relação deste gênero de bactérias com as plantas vão além da fixação de N (LOS SANTOS, BUSTILLOS-CRISTALES e CABALLERO-MELLADO, 2001). Formulações a base de *Burkholderia* spp. podem ser aplicadas para o controle de doenças de plantas, como no estudo em que *B. pyrrocinia* induziu resistência contra *Magnaphorthe oryzae*, suprimindo a brusone em 97% (ARRIEL-ELIAS *et al.*, 2019). Dentre as actinobactérias, o gênero *Frankia* se destaca pela capacidade de induzir nódulos radiculares em diversas plantas não leguminosas, como árvores e arbustos lenhosos. Esse gênero abrange um grupo de actinomicetos do solo que forma esporângios multiloculares, crescimento filamentosos e vesículas com nitrogenase envoltas em envelopes lipídicos multilaminados (BENSON e SILVESTER, 1993; PAWLOWISKI e DEMCHENKO, 2012).

### 3.2 O GÊNERO *Trichoderma*

Os relatos oficiais, publicados em artigos científicos, sobre a utilização de *Trichoderma* para o controle biológico de doenças de plantas aparecem na década de 1930. Johnson e Hoggan (1937) relatam a utilização de microrganismos na inativação do vírus do mosaico comum do fumo (TMV) (JOHNSON e HOGGAN, 1937). Em 1950 Foster, pesquisador do Instituto Agronômico de Campinas, obteve resultados semelhantes com filtrados de cultura de *Trichoderma* na inativação de TMV. Apesar dos resultados de Johnson e Hoggan (1937) e de Foster (1950) não terem sido aplicados na prática, esses trabalhos foram importantes para se criar linhas de investigação interessantes com a utilização do gênero *Trichoderma* (FOSTER, 1945).

Em 1974 Persoon propôs o gênero *Trichoderma*, associando algumas características ao fungo, como: crescimento acelerado em meio de cultura, variação dos conídios entre verde e amarelo ou hialino, formados nas extremidades, conidióforos bem definidos e hifas diferenciadas (SAMUELS, 1996). *Trichoderma* spp. possui a seguinte classificação taxonômica: pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Ordem Hypocreaceae e Família Hypocreaceae (SILVA *et al.*, 2019). A variedade de espécies dentro do gênero *Trichoderma* é grande, apresentando diversos mecanismos de interação com a planta e outros microrganismos e explorando diferentes ambientes. Desta forma, é importante o isolamento de *Trichoderma* a partir de ambientes distintos com características e biomas próprios, acarretando numa maior diversidade genética do fungo, com mecanismos de ação variados e potencial para a utilização em diversas áreas (SUHENDRA *et al.*, 2020).

*Trichoderma* apresenta diversos mecanismos de ação que o torna promissor como agente de controle biológico (ACB). Destacam-se entre essas características o parasitismo, a competição por espaço e nutrientes, a predação, a produção de substâncias antifúngicas e a relação simbiótica mantida com as plantas que desencadeia indução de resistência a fatores bióticos e abióticos e promoção de crescimento. Também pode ser utilizado na recuperação de áreas contaminadas com metais pesados. Tais características adquirem ainda maior importância, se associadas ao conceito de Manejo Integrado de Pragas: Esse sistema associa o ambiente e a dinâmica populacional da espécie, utiliza todas as técnicas apropriadas e métodos de forma tão compatível quanto possível e mantém a população da praga ou do patógeno em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico (WAQUIL, 2002). Fungos do gênero *Trichoderma* atuam utilizando diversos mecanismos de ação, dependendo

de cada espécie, o que torna os fungos deste gênero capazes de manter a eficácia em diferentes estratégias de manejo, podendo ter sua aplicação associada a outros tipos de ferramentas de controle sem acarretar resistência ou outras consequências do uso irresponsável das técnicas tradicionais do manejo agrícola.

Dentro do controle biológico de doenças de planta, *Trichoderma* spp. se destacam em aplicações de controle curativo em diversas culturas de importância econômica, para as grandes produções e na agricultura familiar e orgânica. A competição por espaço e nutrientes, o parasitismo, a produção de substâncias antifúngicas estão por trás do sucesso desta solução. São diversos os estudos que indicam o controle de doenças de plantas utilizando *Trichoderma* e apontando mais de um mecanismo de ação. Como é o caso de um estudo realizado em begônias, utilizando *Trichoderma asperellum* (LQC96) para o controle de *Botrytis cinerea* e *Myrothecium roridum*, no qual testes *in vitro* revelaram a produção de substâncias inibidoras dos fitopatógenos, assim como parasitismo no contato direto das duas culturas em placas de Petri e, nos ensaios *in vivo* houve a redução da incidência da doença após aplicações semanais (FUJINAWA *et al.*, 2020).

O micoparasitismo exercido por fungos do gênero *Trichoderma* está associado à sua capacidade de penetrar em fitopatógenos. Trabalhos realizados com *Trichoderma atroviride* (KAPPEL *et al.*, 2020) demonstraram a ação de enzimas modificadoras da quitina, componente da parede celular de fungos fitopatogênicos que responde às condições de crescimento, estresses ambientais e mecanismos de adaptação e defesa do hospedeiro. Para compreender melhor a estratégia de micoparasitismo do gênero *Trichoderma*, um estudo realizado utilizando análise transcriptômica comparativa identificou genes que estão envolvidos na produção de enzimas e efetores que influenciam nas respostas parasitárias em várias espécies de *Trichoderma*, como *T. virens*, *T. asperellum* e *T. asperelloides* (ATANASOVA *et al.*, 2013). Este trabalho conclui que o micoparasitismo no gênero *Trichoderma* se diferenciou em várias estratégias alternativas, que vão desde o parasitismo, predação e saprotrofia.

A competição por espaço e nutrientes é outro mecanismo de ação utilizado por *Trichoderma* no controle biológico de doenças de plantas. Um estudo realizado com *Trichoderma* spp., isolados de framboesas selvagens e fitopatógenos (*Colletotrichum* sp., *Botrytis* sp., *Verticillium* sp. e *Phytophthora* sp.), avaliou a competição nutricional, calculada com base na utilização de substratos (adonitol, D-arabitol, i-eritriol, glicerol, D-manitol e D-sorbitol) que servem como aditivos em biopreparação de *Trichoderma*. O estudo concluiu que o *Trichoderma* spp. utilizou de forma eficaz os substratos testados, de forma que a adição

dos mesmos na preparação dos produtos biológicos traz vantagens na aplicação do produto (OSZUST *et al.*, 2020).

Um isolado de *Trichoderma harzianum* (MRI349) foi testado em um ensaio de controle biológico *in vitro* contra isolados de *Aspergillus*. Este fungo produz micotoxinas que contaminam as colheitas de várias culturas, podendo desencadear câncer em humanos e animais. Através da microscopia eletrônica de varredura, pôde-se observar que o isolado de *T. harzianum* se ligava ativamente aos isolados de *Aspergillus*, causando lise enzimática nos filamentos miceliais, provando a eficácia do *Trichoderma* como um competidor biológico (BRAUN *et al.*, 2018).

Algumas espécies de *Trichoderma* se destacam como agentes de controle biológico pela produção de substâncias antifúngicas, que podem ser classificadas como voláteis e não-voláteis. É o caso de dois produtos comerciais (Biotrich® e Ecotrich®) produzidos a base de *Trichoderma* sp. e *T. harzianum*, respectivamente, que inibiram *Cladosporium* spp. isolado da cultura de noz-pecã, tanto por confrontação direta como por meio de compostos voláteis (ROLIM *et al.*, 2019). Revisão de literatura realizada por LI, LI E ZHANG (2019) encontrou cerca de 390 metabólitos não-voláteis produzidos por 20 espécies conhecidas e outras desconhecidas de *Trichoderma*. A produção do metabólito secundário 6-pentil- $\alpha$ -pirona(6-PP) por *T. atroviride* está associada a atividades antifúngicas e a promoção de crescimento de plantas. Para entender esta relação, foi realizado um estudo do papel do gene *lox1*, que codifica a enzima Lipoxigenase1, no qual foi constatado que a luz inibe a biossíntese da 6-PP, porém a *lox1* é dispensável para a produção do composto. Entretanto, *Lox1* estaria envolvida na produção de vários outros metabólitos, incluindo oxilipinas e compostos orgânicos voláteis e na indução de resistência a fungos fitopatogênicos, como foi o caso da infecção de *Botrytis cinerea* em plantas de *Arabidopsis thaliana* (SPECKBACHER *et al.*, 2020).

A capacidade de manter uma relação simbiótica com a planta, desencadeia uma série de vantagens, entre elas está a promoção de crescimento que conseqüentemente pode ter relação com a indução de resistência a fatores bióticos, como doenças de plantas ou abióticos, como danos causados por salinidade ou seca. Geralmente, isolados de *Trichoderma* que apresentam essas características, possuem o potencial biológico de exercer dois ou mais mecanismos de ação para diferentes óbices. Isso foi observado em um estudo realizado com três espécies: *T. aggressivum* f. sp. *europaeum*, *T. saturnisporum* e *T. longibrachiatum*, que foram testadas com o objetivo de aumentar a resistência ao excesso de cloreto de sódio (NaCl) *in vitro* e *in vivo* em plântulas de melão, submetidas a solo salino e

à infecção causada pelo oomiceto *Pythium ultimum*. Foi observado que os três isolados conseguiram reduzir a incidência da doença nas plantas, reduzindo a severidade da doença em até 62,96%, enquanto que as plantas tratadas com *Trichoderma* apresentaram aumento de massa seca acima de 80% na parte aérea, e de 50% para o sistema radicular, mesmo sob estresse salino (SÁNCHEZ-MONTESINOS *et al.*, 2019).

Os mecanismos por trás da promoção de crescimento e da indução de resistência nas plantas, desencadeados pela relação do fungo com a planta, estão associados a vários fatores como: a capacidade de fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de osmólitos como a L-prolina, produção de ácido abscísico, produção de enzimas como catalase, peroxidase, celulase, fenilalanina amônia-liase, polifenoxidase entre outras. São inúmeros os trabalhos e estudos realizados para a identificação desses processos induzidos por vários isolados de *Trichoderma*, oriundos de diferentes nichos ecológicos. *Trichoderma* e outros microrganismos promotores de crescimento já foram avaliados em diversas culturas como o milho (MPANGA *et al.*, 2019), *Syringa oblata* (LIU *et al.*, 2020), soja (Macena *et al.*, 2020), pepino (LI, LI e ZHANG, 2019) e trigo (IKRAM *et al.*, 2019), entre outras.

A indução de resistência desencadeada pela relação com um agente de controle biológico é caracterizada pela ativação de mecanismos de defesa das plantas, tais como compostos fenólicos, enzimas de proteção, ácidos hidroxycabóxicos, espécies reativas de oxigênio, proteínas relacionadas a patogênese, entre outros (STANGARLIN, *et al.*, 2011). São comuns exemplos de trabalhos demonstrando a eficácia do *Trichoderma* em desencadear este tipo de reação em várias espécies vegetais, tais como: cebola (ELSHARKAWY e EL-KHATEEB, 2019), arroz (SHASMITA *et al.*, 2019), soja e feijão (FERREIRA *et al.*, 2019) e milho (YU *et al.*, 2020). Esse tipo de resistência é classificada como resistência induzida, pois utiliza agentes externos para ativar os mecanismos da planta sem executar qualquer alteração no genoma da planta (STADNIK e BUCHENAUER, 2000).

O aumento da população e dos centros urbanos aumentaram a demanda por diversos serviços na sociedade, trazendo consequências para o meio ambiente como a contaminação do solo, água e atmosfera por metais pesados (SOUZA, MORASSUTI e DEUS, 2018). O acúmulo de cádmio, chumbo, cobre, mercúrio, cobalto, zinco, manganês, arsênio e níquel são cada vez mais comuns no meio ambiente e a população acaba se contaminando através do consumo de alimentos advindos desses locais (YAGHOUBIAN *et al.*, 2019). Além de agente de controle biológico, *Trichoderma* também se destaca como biorremediador de locais contaminados. Além de sua capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos, inclusive em condições extremas, com elevado pH, temperatura e escassez de nutrientes

(PANDEY *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2019), esses fungos são capazes de realizar a desintoxicação de metais pesados através de algumas estratégias como o efluxo de metais da membrana celular, quelação intracelular por proteínas metalotioneínas, fitoquelatinas e a compartimentação de metais pelos vacúolos (LALRUATFELA e LALTHANPUII, 2020).

Um trabalho de fitorremediação executado com a aplicação de *T. harzianum* em plantas de *Arundo donax*, demonstrou o potencial do isolado em bioacumular Cd, Cu e Hg, promovendo crescimento da planta mesmo em solo contaminado (CRISTALDI *et al.*, 2020). Os benefícios de um agente de controle biológico que seja tolerante a situações extremas, como é o caso do acúmulo de substâncias tóxicas, impactam diretamente o manejo agrícola, já que um isolado com tal característica pode ser usado em consórcio ao controle químico ou à aplicação de outras moléculas químicas que tragam algum benefício para a produção. Isolado de *T. asperellum* selecionado com base em sua tolerância a doses de Cu, através do acúmulo do metal em suas células, foi aplicado juntamente com três fungicidas a base de Cu (viz, Blitox-50 e Kocide) para o controle da requeima da batata (*Phytophthora infestans*) em campo. A combinação Blitox-50 a 500 ppm e *T. asperellum* foi considerada mais eficaz em reduzir a severidade da requeima do que somente Blitox-50 a 1000 ppm, demonstrando assim a capacidade do isolado em fazer parte de um manejo integrado (LADI *et al.*, 2020).

### 3.2.1 GÊNOMICA DE *Trichoderma*

Para entender o funcionamento de qualquer organismo, o conhecimento do seu genoma é essencial, devido à informação que ali está contida em seu DNA. No National Center for Biotechnology Information (ncbi.nlm.nih.gov) estão depositados atualmente 32 genomas de espécies de *Trichoderma*: *T. reesei* (MARTINEZ *et al.*, 2008), *T. virens* (KUO *et al.*, 2015), *T. atroviride* (KUBICEK *et al.*, 2011), *T. longibrachiatum* (DRUZHININA *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2014), *T. hamatum* (STUDHOLME *et al.*, 2013), *T. harzianum* (BARONCELLI *et al.*, 2015), *T. gamsii* (BARONCELLI *et al.*, 2016), *T. parareesei* (YANG *et al.*, 2015), *T. arundinaceum*, *T. brevicompactum* (PROCTOR *et al.*, 2018), *T. atrobrunneum* (FANELLI *et al.*, 2018), *T. asperellum* (DRUZHININA *et al.*, 2018), *T. koningiopsis* (CASTRILLO, *et al.*, 2017), *T. guizhouense* (DRUZHININA *et al.*, 2018), *T. koningii*, *T. pleuroti*, *T. citrinoviride* (DRUZHININA *et al.*, 2018), *Trichoderma* sp. IMV00454, *T. viride*, *T. oligosporum*, *T. lixii* (VENICE *et al.*, 2020), *T. erinaceum*, *T. lentiforme*, *Trichoderma* sp. TW21990\_1, *T. afroharzianum*, *T. sp.* TMT1J1, *T. comudamae* (submissão direta-não publicado), *T. asperelloides* (GORTIKOV *et al.*, 2022), *T.*

*semiorbis* (LI e LIU, 2022a), *T. gracile* (LI e LIU, 2022b), *T. simmonsii* (CHUNG, KWON e YANG, 2021) e *T. brevichassum* (ZHANG e ZHUANG, 2020).

Fungos filamentosos geralmente possuem genomas de tamanho reduzido. Os tamanhos dos genomas das espécies de *Trichoderma* já sequenciados variam entre 32 a 41 Mb, com um número de cromossomos variando de 3 a 7 (SRIVASTAVA e SHAHID, 2014). Dentre as espécies cujo genoma está descrito na base de dados do NCBI, *T. reesei* possui importância para a indústria devido à capacidade de produção de celulases e outras enzimas. As espécies *T. virens* e *T. atroviride* são descritas como importantes micoparasitas, e para a espécie *T. harzianum*, importante agente de controle biológico e base de diversos fungicidas microbiológicos. Portanto, há genomas de cinco isolados de *Trichoderma* já disponíveis.

O isolado TR274 de *T. harzianum*, obtido de solo de cerrado, teve seu genoma sequenciado em estudo realizado na UnB e Universidade da Califórnia – Berkeley, por Steindorff (2016), também do mesmo bioma, o isolado TR356 de *T. aperelloides*. Trata-se do primeiro isolado brasileiro de *Trichoderma* sequenciado. Esse estudo também englobou a análise do transcriptoma do fungo na interação com *Sclerotinia sclerotiorum* ou na presença de sua parede celular. Interessantemente, este é o único relato de *T. harzianum* sensu strictu no Brasil, com base nos critérios de Chaverri *et al.* (2016).

Estudos comparativos de genomas de *Trichoderma* têm possibilitado novas interpretações sobre a evolução destes fungos (KUBICEK *et al.*, 2011; SCHMOLL *et al.*, 2016). Os genomas de duas espécies micoparasíticas, *T. atroviride* e *T. virens*, de amplo emprego como agentes de biocontrole de doenças de plantas, e uma espécie saprotrófica, *T. reesei*, com amplo uso biotecnológico para a produção de enzimas celulolíticas foram estudados por Kubicek *et al.* (2011). A comparação dos genomas mostrou que o hábito micoparasítico é ancestral no gênero *Trichoderma*, mas os genes que conferem este estilo de vida foram posteriormente perdidos na espécie mais derivada que é *T. reesei*. Em estudo ainda mais detalhado sobre essas mesmas espécies de *Trichoderma*, Schmoll *et al.* (2016) observaram, entre outras características, que o modo de vida micoparasítico de *T. atroviride* e *T. virens* está associado a uma expansão do número de genes codificadores de proteínas transportadoras (detoxificação e absorção de nutrientes), de enzimas degradadoras da parede celular de fungos (quitinases e glucanases), de fatores de transcrição e de proteínas extracelulares potencialmente envolvidas na interação com a planta hospedeira.

Diversos genes de espécies de *Trichoderma*, envolvidos na promoção de crescimento, antagonismo a patógenos, colonização da planta, tolerância a estresses e outras características, já foram descritos em estudos focados nesses processos. O conjunto desses

estudos fornece um painel dos diferentes mecanismos que fungos deste gênero empregam para o controle biológico de doenças e promoção de crescimento de plantas.

O gene *Tvsp1* de *T. virens* codifica uma serina protease que quando superexpressa pelo fungo aumenta sua capacidade de proteger mudas de algodão contra *Rhizoctonia solani* (POZO *et al.*, 2004). Os genes *tgaA* e *tgaB*, codificadores de subunidades alfa de proteína G, também estão relacionados ao biocontrole de patógenos de solo, como *R. solani* e *Sclerotium rolfsii* (MUKHERJEE *et al.*, 2004), assim como o gene *tac1* (codificador de uma adenilato ciclase) afeta a atividade de micoparasitismo de *T. virens* sobre *R. solani* e *Pythium ultimum* (MUKHERJEE e KALE, 2007). O gene *tvGST* (glutathione transferase) de *T. virens* conferiu a plantas transgênicas de tabaco tolerância ao metal pesado cádmio, que é considerado carcinogênico e acarreta diversos problemas de saúde para seres humanos. Apesar de tolerantes, essas plantas não acumularam o cádmio, o que é desejável, pois não há transferência do metal pesado para a cadeia alimentar (DIXIT *et al.*, 2011).

Na espécie *T. atroviride*, o gene *taabc2*, codificador de uma proteína transportadora de membrana do tipo ATP-binding cassette (ABC), confere resistência a compostos inibitórios produzidos por fungos fitopatogênicos e afeta sua capacidade de proteger plantas de tomate contra *Pythium ultimum* e *R. solani* (RUOCCO *et al.*, 2009).

Em *T. harzianum*, o gene *tri5* está ligado à produção da toxina tricoteceno, que inibe a síntese de DNA e proteinases em fungos fitopatogênicos, afetando seu crescimento (TIJERINO *et al.*, 2011). O gene *ThPG1* codifica uma endopoligalacturonase, enzima envolvida na degradação da parede celular de plantas e que é necessária para a colonização de raízes e ativação das defesas das plantas (EUGENIA *et al.*, 2009). O gene *Th-Chit* é conhecido por conferir atividade antifúngica em plantas transgênicas de tabaco (SAIPRASAD *et al.*, 2009). O gene *erg1* codifica a enzima esqualeno-epoxidase na via biossintética do ergosterol e, quando superexpresso, resulta em redução do nível de esqualeno e diminui a capacidade de *T. harzianum* em ativar a SAR em tomate (CARDOZA, MALMIERCA e GUTIÉRREZ, 2014). O gene *Thkel1* codifica uma proteína com repetições Kelch que aumenta a tolerância ao sal e ao estresse osmótico em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* (HERMOSA *et al.*, 2011). O gene *qid74* codifica uma proteína de parede rica em cisteínas que desempenha papel na proteção celular e adesão a superfícies hidrofóbicas. Quando este gene é superexpresso em *T. harzianum*, plantas colonizadas pelo fungo apresentam raízes laterais mais longas e pelos mais numerosos e longos em raízes secundárias, o que aumenta a superfície de absorção de nutrientes (SAMOLSKI *et al.*, 2012).

Proteínas de *Trichoderma* envolvidas na interação com a planta hospedeira já foram descritas para diversas espécies do gênero. Na categoria das MAMPs (microbe-associated molecular patterns), encontramos a proteína cerato-platanin SM1/EPL1 (GOMES *et al.*, 2015), a xilanase indutora de etileno EIX (RON e AVNI, 2004) e a proteína Swollenin (BROTMAN *et al.*, 2008). Potenciais proteínas efetoras, que modulam a resposta de defesa de plantas, foram identificadas por meio de ferramentas de bioinformática dentre o repertório de proteínas secretadas por *T. atroviride*, *T. virens* e *T. reesei* (DRUZHININA, SHELEST e KUBICEK, 2012; GUZMÁN-GUZMÁN *et al.*, 2017; SCHMOLL *et al.*, 2016).

A resposta de plantas de tomate à inoculação com *T. harzianum* ou seu metabólito ácido harziânico, na presença ou ausência de *Rhizoctonia solani*, foi avaliada empregando-se microarranjo contendo 25.789 sondas (TomatoArray 2.0, CombiMatrix) (MANGANIELLO *et al.*, 2018). Tanto *T. harzianum* quanto o ácido harziânico induziram a expressão de genes envolvidos em respostas de defesa da planta englobando as vias do etileno, jasmonato e ácido salicílico e vias de detoxificação celular contra espécies reativas de oxigênio. No mesmo estudo, análises de metabolômica mostraram que o fungo e seu metabólito também induziram o acúmulo de glicoalcaloides esteroidais indicando a ativação de defesas químicas pela planta.

O efeito contrário, ou seja, a ativação de genes de *Trichoderma* induzida pela interação com plantas de tomate, foi estudada através de microarranjos por Rubio *et al.* (2012). Dentre os genes de *T. harzianum*, *T. virens* e *T. hamatum* induzidos pela planta, destacaram-se aqueles codificadores de enzimas envolvidas na degradação de quitina.

Estudo recente sobre o transcriptoma de raízes de plantas de tomate inoculadas com *T. harzianum* empregando RNA-seq foi realizado por De Palma *et al.* (2019). As principais funções afetadas pela presença do fungo foram reconhecimento e transdução de sinal, resposta a estresse, regulação transcricional e transporte. A ativação da via do ácido salicílico preponderou sobre a do jasmonato e a indução de genes de transportadores de nutrientes indicou um forte efeito em processos de aquisição de nutrientes que podem explicar a promoção de crescimento promovida pelo fungo.

Os estudos recentes sobre o genoma de *Trichoderma* e outros fungos e sobre o transcriptoma de plantas têm empregado frequentemente as tecnologias de sequenciamento Illumina, 454 ou Ion Torrent (BARONCELLI *et al.*, 2015, STEINDORFF, 2016; FANELLI *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2014). A possibilidade de obtenção de grandes quantidades de sequências com menor custo possibilitam uma grande cobertura do genoma. Por outro lado, as sequências curtas obtidas principalmente em sequenciador Illumina HiSeq 2500,

dificultam a montagem do genoma. Uma nova tecnologia de sequenciamento que está sendo rapidamente adotada em diferentes laboratórios é a da Oxford Nanopore, sendo o aparelho MinION seu carro chefe. Embora a capacidade de bases geradas seja menor que a da tecnologia Illumina, a possibilidade de obtenção de sequências ultra-longas (até mais de 1 Mb já relatadas), simplicidade de preparo de amostras e manuseio do aparelho e baixo investimento com o equipamento, explicam a rápida adoção da tecnologia. Dada as vantagens de cada uma dessas tecnologias, uma combinação de ambas em montagens híbridas tem sido utilizada em estudos recentes para a obtenção de genomas completos com contigs mais longos e maior acurácia (GIORDANO *et al.*, 2017; TAN *et al.*, 2018)

### **3.2.2 COLEÇÃO DE FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma* DA UNIDADE LABORATORIAL DE REFERÊNCIA EM BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA DO INSTITUTO BIOLÓGICO - ULRBMA**

A coleção de isolados de *Trichoderma* da ULRBMA foi constituída a partir de coletas de amostras de solos realizadas em 52 pontos geográficos localizados em diferentes biomas do Estado de São Paulo no ano de 2001 (CORABI-ADELL, 2005).

Os isolados desta coleção foram, recentemente, submetidos a nova identificação por meio de sequenciamento do gene do fator de alongação, o qual permite melhor separação de espécies quando comparado à região ITS (internal transcribed spacer) utilizada anteriormente. Com isso, 64 isolados da coleção que eram considerados como pertencentes à espécie *T. harzianum*, foram separados em 4 espécies: *T. lentiforme* (47 isolados), *T. endophyticum* (11 isolados), *T. inhamatum* (3 isolados) e *T. camerunense* (3 isolados). Esta nova classificação está baseada em revisão taxonômica do complexo de espécies *T. harzianum* (CHAVERRI *et al.*, 2016). Nota-se que não se constatou a presença de *T. harzianum*. Os demais 60 isolados da coleção foram identificados como: *T. koningiopsis* (15), *T. atroviride* (12), *T. asperelloides* (12), *T. spirale* (7), *T. koningii* (3), *T. strigosum* (3), *T. hamatum* (2), *T. virens* (2), *T. asperellum* (1), *T. tomentosum* (1), *T. longibrachiatum* (1) e *T. orientale* (1). A ausência de *T. harzianum* *sensu strictu* na coleção confirma a observação de Chaverri *et al.* (2015) de que essa espécie é restrita a regiões temperadas da América do Norte e Europa, por outro lado, esses autores afirmaram que *T. endophyticum* é estritamente endofítico e *T. lentiforme* preponderantemente endofítico, o que é conflitante com a origem de solo dos isolados destas espécies da coleção da ULRBMA.

Estudos realizados com vários isolados da coleção, em casa de vegetação, evidenciaram a capacidade de promover crescimento e de proteger contra doenças em

plantas de pepino, feijão, soja e tomate (FONTENELLE *et al.*, 2011; HADDAD *et al.*, 2017; LUCON *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; SOUZA-PEDRO *et al.*, 2012). Alguns destes isolados estão sendo avaliados em campo através de parcerias com empresas produtoras de insumos de controle biológico, sendo que o isolado 19/17 de *T. camerunense* recebeu especificação de referência para o controle do mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em agricultura orgânica (Instrução Normativa 109, SDA-MAPA, 13/11/2020).

### 3.3 TECNOLOGIA DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

O processo de sequenciamento em que as 4 bases nucleotídicas (Adenina, Guanina, Citosina e Timina) se apresentam na molécula de DNA, é essencial para que se obtenha informações sobre um determinado gene ou genoma, e conseqüentemente, se aprofundar em sua função em relação a questões hereditárias, bioquímicas que se refletem na vida dos organismos (HEATHER e CHAIN, 2015). Desde a inovação apresentada por Mendel em 1850, ao demonstrar que características hereditárias podem ser transmitidas entre os indivíduos através das gerações, até os dias atuais, a técnica de sequenciamento de DNA evoluiu gradativamente. Hoje, pode-se classificar o processo em gerações, sendo a 1ª aquela desenvolvida por Frederick Sanger; os de 2ª geração dão início ao next-generation sequencing – NGS, aperfeiçoada pela companhia de biotecnologia 454 Life Sciences, fundada por Jonathan Rothburg e os modelos de 3ª geração, onde aqui se considerará os sequenciamentos que são capazes de sequenciar moléculas únicas, sem a necessidade reações de amplificação, como a Oxford Nanopore Technologies (GUZVIC, 2013).

O método de sequenciamento de DNA Sanger, recebeu o sobrenome do seu idealizador: Frederick Sanger. Este bioquímico inglês foi premiado com o Nobel de Química em 1958 e, novamente, em 1980. Sanger desenvolveu os métodos de sequenciamento de aminoácidos e de ácidos nucléicos (WATTS, 2013). Os primeiros sequenciadores de DNA automatizados foram baseados no método de terminação de cadeia desenvolvido por Sanger, onde a marcação dos dideoxynucleotídeos com <sup>32</sup>P radioativo no método original, foi substituída pela marcação com quatro fluoróforos distintos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977)

Um importante acontecimento, que envolve o sequenciamento de DNA de primeira geração, é o projeto de sequenciamento do genoma humano. Esse projeto representou para a sociedade um marco importante no avanço científico, mas se provou em outro aspecto uma espécie de prêmio, pelo desafio que foi concluí-lo. Através da automação do sequenciamento

de DNA e da estratégia de “shotgun” do genoma inteiro, a empresa Celera do pesquisador Craig Venter sequenciou 3,2 bilhões de pares de bases do genoma humano em 9 meses de trabalho (JASNY e ZAHN, 2011). Houve impactos, nos anos posteriores ao sequenciamento, através da aceleração da pesquisa biomédica, em busca das causas de doenças hereditárias e dos diversos tipos de câncer,(LANDER, 2011).

O método de pirosequenciamento consiste na utilização de duas enzimas (sulfurilase e luciferase) que converte o pirofosfato em ATP e o utiliza como substrato para a produção de luz, que por sua vez é capturada com uma câmera(HEATHER e CHAIN, 2015). Esse avanço deu início ao que foi denominado de sequenciamento de nova geração, ou NGS das iniciais de next-generation sequencing, permitindo a obtenção de milhões de leituras curtas de sequenciamento em uma única reação. Esse avanço foi comercializado pela empresa de biotecnologia 454 Life Sciences (Roche) (MARGULIES *et al.*, 2005).

Posteriormente, outras tecnologias NGS começaram a surgir no mercado, como é o caso da Solexa, através do equipamento Genome Analyzer - GA. Em 2005, a Solexa lançou sua técnica de sequenciamento por síntese, utilizando química de terminadores marcados reversível, e em 2007 foi comprada pela Illumina. A Illumina aperfeiçoou suas plataformas e desenvolveu uma série chamada de HiSeq: 1000, 1500, 2000, 2500 que foram gradativamente aumentando a capacidade de sequenciamento. O equipamento HiSeq 2500 tem a capacidade de sequenciar o genoma humano em 24 horas ou 30 amostras de RNAseq em 5 horas. Em 2011 a Illumina lançou outra plataforma o MiSeq, que detem a maioria das características da HiSeq, e gera 1,5 Gbp por corrida num prazo de 10 horas (BARBA, CZOSNEK e HADID, 2013).

O NGS também inclui a tecnologia SOLiD (Sequenciamento por Oligo Ligation Detection), que foi adquirida pela Applied Biosystems em 2006. A plataforma SOLiD lançou em 2007 o sistema de sequenciamento SOLiD 5500 e em 2010 o SOLiD 5500 xlw. Essa ultima versão tem comprimentos de leitura de 85 bp, com 99% de precisão e 30 Gb por corrida, que pode ser concluída em uma semana (LIU *et al.*, 2012). Essa tecnologia foi descontinuada, tendo sido substituída pela tecnologia Ion Torrent pela Applied Biosystems.

O método utilizado pelo 454 da Roche, teve duas mudanças e deu origem a um sequenciador denominado de Ion Torrent. A primeira modificação refere-se à detecção das seqüências nucleotídicas, que é realizada eletronicamente pela mudança do pH da solução circundante, e isso é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados. A segunda alteração é em relação à reação de sequenciamento em si, que é executada dentro de um microchip, que atua como uma câmara de fluxo (flowcell) com sensores eletrônicos na parte

abaxial de cada célula. O primeiro modelo com essa tecnologia a ser lançado foi o Personal Genome Machine – PGM, um sequenciador de bancada, que foi sucedido pela linha Ion Proton e Ion Gene Studio, sendo este último capaz de gerar até 130 milhões de sequências (KULSKI, 2015).

As tecnologias de sequenciamento de DNA estão recebendo cada vez mais atualizações, deixando o processo mais rápido, prático, preciso e eficaz. Esse desenvolvimento acompanha o ritmo de diversos setores da indústria tecnológica, o que fez com que o NGS fosse responsável por grandes avanços em diversas linhas de pesquisa (CAREW *et al.*, 2013; HARRISSON e KIDNER, 2011; JAGADEESAN *et al.*, 2019; PRAVETTONI, 2020; SOLIMAN *et al.*, 2017). Através dessas atualizações, um novo grupo de tecnologia de sequenciamento passou a ser classificado como o sequenciamento de terceira geração. Duas razões principais distinguem esse grupo: não é necessário a utilização da técnica de amplificação – PCR, o que reduz o tempo de preparação das amostras e o sinal da técnica de sequenciamento, seja ele qual for, é monitorado em tempo real.

O sequenciamento de DNA de terceira geração tem a característica de sequenciar moléculas únicas, em inglês: “single molecule sequencing” (SMS), tendo sido introduzido pelo pesquisador Stephen Quake posteriormente comercializado pela companhia Helicos BioSciences. Nesta técnica as amostras de DNA são anexadas em uma base plana, em seguida, os dNTPs de terminador reversível e fluorescente são introduzidos uma base por vez, eles são fotografados antes de serem clivados e o ciclo é reiniciado. A tecnologia era considerada onerosa e lenta, entretanto, foi a primeira a permitir o sequenciamento sem amplificação (THOMPSON e MILOS, 2011). O sequenciamento SMS se tornou alvo de desenvolvimento de grandes companhias na área da biotecnologia, esse método é promissor, se comparado aos de segunda geração, por conseguir sequenciar moléculas longas em menor tempo o que se torna ideal para resolver problemas biológicos específicos. Sequenciar moléculas longas traz alguns riscos, como um rendimento mais baixo, uma taxa de erro maior e um custo por base mais elevado (RHOADS e AU, 2015).

A Pacific Biosciences – PacBio desenvolveu um método chamado sequenciamento em tempo real de molécula única – SMRT, que oferece soluções para diversos problemas presentes em técnicas anteriores. O sistema PacBio produz sequências de até 60.000 bases, é mais veloz do que sistemas de segunda geração, leva aproximadamente 1 a 3 segundos para sequenciar um nucleotídeo, e possui uma taxa de erro bruta de 15 a 20%. O método é baseado na detecção da incorporação de nucleotídeos marcados com fluoróforos em um fragmento de DNA depositado em uma unidade de sequenciamento denominada “zero-mode

waveguide” (ZMW), na qual uma DNA polimerase se encontra imobilizada (MCCARTHY, 2010). Os equipamentos mais recentes da PacBio, Sequel II Systems, produzem até 4 milhões de sequências longas em um período de 30 h.

Ainda no objetivo do sequenciamento de moléculas mais longas e com menor tempo, em 2014 a Oxford Nanopore lançou um sequenciador de tamanho reduzido chamado de MinION. O sequenciador mede 10 cm de comprimento e tem a vantagem de ser portátil, devido ao tamanho, sendo conectado por uma porta USB 3.0 de um computador de mesa ou laptop. O método consiste na ligação da primeira fita da molécula de DNA da amostra por um grampo na sua fita complementar, o fragmento é capturado por um poro composto de proteínas, chamado de nanopore. Ao passar pelo poro, acontece a leitura do fragmento de DNA, por meio da ação de uma proteína motora que está alocada no poro. A passagem da fita de DNA gera uma variação de corrente iônica, que é consequência dos diferentes nucleotídeos que atravessam o poro. O sinal de variação de corrente é enviado para uma dashboard gráfica, onde é registrada em tempo real e pode ser usada para interpretar a sequência. O MinION, tem como características o baixo custo de sequenciamento, sua praticidade por conta do tamanho reduzido e a visualização do sequenciamento enquanto está sendo executado, não sendo necessário sua conclusão. As leituras longas executadas no MinION podem chegar a até mais de 1 Mb, porém possui uma taxa de erro de entre 10 e 15%, sendo necessário também o cuidado de não partir o DNA mecanicamente na extração da amostra. A Oxford Nanopore desenvolveu também uma plataforma maior chamada PromethION, capaz de processar 48 flowcells simultaneamente gerando 2 a 4 Tb em um período de 2 dias, o que o torna extremamente competitivo se comparado a outras tecnologias de sequenciamento (KCHOUK, GIBRAT e ELLOUMI, 2017).

## CAPÍTULO 1 – EFEITOS DA APLICAÇÃO DE *Trichoderma lentiforme* e *Trichoderma camerunense* EM PLANTAS DE TOMATEIRO EM DIFERENTES PATOSSITEMAS

### 4. INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança alimentar, com a preservação ambiental e com a saúde da população são fatores que elevam a discussão do uso de técnicas de manejo agrícola mais seguras, que causem menos impactos ambientais e que não sejam nocivas à saúde do trabalhador. O controle biológico adquire importância nesta discussão como uma ferramenta capaz de contribuir para uma produção alimentar mais saudável, e isso é ainda mais importante em países onde ainda não há a predominância do uso responsável dos agroquímicos (FROTA e SIQUEIRA, 2021; MORAES, 2019). Nos países em desenvolvimento, os biopesticidas e biofertilizantes são considerados de extrema importância, já que os trabalhadores não possuem roupas de proteção necessária para utilização dos agroquímicos, e o custo está oneroso para o pequeno produtor (HARMAN *et al.*, 2010).

A pesquisa de base de controle biológico de doenças de plantas em países como o Brasil, ainda é de grande importância, primeiramente pela diversidade microbiana encontrada nos diversos biomas presentes no território nacional (CABRAL *et al.*, 2019; SOUTO *et al.*, 2008), assim como a capacidade de investir e tornar um dos negócios base da economia brasileira (BARROS, 2020; HEREDIA, *et al.*, 2010), como exemplo de sustentabilidade. Para isso, é necessário investimento e conhecimento técnico, científico e em tecnologias que facilitem o desenvolvimento de agentes microbianos, com intuito de testar sua eficácia e conhecer seus mecanismos de ação, para a partir disso utilizá-los em estratégias de manejo específicas.

Para o mapeamento dessas estratégias, conhecer esse organismo geneticamente é importante, já que o material genético contém toda informação que será necessária para a formulação de um produto seguro que seja aprovado pelos órgãos de regulamentação oficiais. Atualmente, o registro de produtos biológicos requer esforços e custo para se ter as avaliações em testes toxicológicos e ambientais. Esses registros cobrem ações específicas desses agentes microbianos, tornando produtos como misturas ou que tenham efeitos mais gerais sob a saúde das plantas mais difíceis de serem registrados. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a testagem dos isolados de *T. camerunense* IB 19/17e *T. lentiforme* IB

30/07 e na interação com plantas de tomateiro em diferentes situações de manejo, como promoção de crescimento, indução de resistência a *Fusarium oxysporum* e efeito na germinação das mudas de tomateiro.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados IB - 30/07 (*T. lentiforme*) e 19/17 (*T. camerunense*) são oriundos da coleção da ULBRAMA (CORABI-ADELL, 2005), enquanto que o isolado 14/11 (*Botrytis cinerea*) pertence a coleção de fungos fitopatogênicos do Instituto Biológico – Micoteca “Mario Barreto Figueiredo”. O isolado de *Fusarium oxysporum* foi obtido a partir de mudas de caqui (*Diospyros kaki*) com sintomas de fusariose, advindas do Núcleo de Produção de Mudas de São Bento do Sapucaí – SP. Para execução dos ensaios, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo o meio Batata, dextrose e ágar – BDA e para períodos prolongados foram mantidos em freezer a -80°C em solução de glicerol 50%.

### 5.2 SUBSTRATOS COMERCIAIS

Na execução dos ensaios *in vivo*, foram utilizados dois substratos comerciais:

Tropstrato:



Composição: Casca de Pinus, Vermiculita, PG MIX 14.16.18, Nitrato e Potássio, Superfosfato Simples e Turfa.

**Figura 1** – Saco de 25 kgs de substrato Tropstrato

Web site: [Vidaverde.agr.br](http://Vidaverde.agr.br), 2021

Vivatto:



Composição: Casca de pinus bio-estabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica.

**Figura 2** – Saco de 25 kgs de substrato Vivatto

Web site: [Technes.com.br](http://Technes.com.br) , 2021

### **5.3 ENSAIOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO**

#### **5.3.1 AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE *Trichoderma* spp. VIA IRRIGAÇÃO E ARROZ COLONIZADO**

Os isolados 30/07 e 19/17 foram repicados a partir dos tubos de ensaio para placas de Petri contendo meio BDA. Após incubação de 72 horas a 28°C, foi obtida uma suspensão de conídios em 1 mL de água destilada esterilizada, da qual uma alíquota de 300 µL foi transferida para 400 g de arroz autoclavado que foi posteriormente incubado a 25°C por 5 dias. Para o preparo do inóculo a ser aplicado via irrigação, o mesmo procedimento de repicagem em meio BDA foi realizado, todavia, após a incubação de 72 horas, foi obtida uma suspensão de conídios com 1 mL de água MilliQ autoclavada para a contagem dos mesmos na câmara de Neubauer. Foram realizadas diluições com o objetivo de chegar a suspensões com 10<sup>5</sup> conídios/ mL. Vasos de polietileno de 500 mL de volume foram preenchidos com substrato comercial (Tropstrato HT), metade dos vasos foi infestada previamente com 2% (peso:volume) do arroz colonizado por *Trichoderma* spp.

Para a produção de mudas, foram utilizadas sementes de tomate (Var. Santa Clara), semeadas em sementeiras de 125 alvéolos que foram transplantadas após 25 dias de

crescimento para os vasos com substrato. Foram transplantadas duas plantas por vaso e após uma semana uma foi desbastada. Os vasos que não possuíam substrato infestado com arroz colonizado receberam 5 mL da suspensão de *Trichoderma* preparada previamente, via irrigação. Para os tratamentos controle, foi realizado o mesmo procedimento, contudo, o substrato foi adicionado com arroz autoclavado ou foi aplicado apenas 5 mL de água destilada esterilizada. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e, após quatro semanas do transplante, realizada a avaliação dos parâmetros biométricos: altura, diâmetro e massa seca.

### **5.3.2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO POR *Trichoderma* spp UTILIZANDO O SUBSTRATO COMERCIAL VIVATTO, COLONIZAÇÃO DE RAÍZES E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À INFECÇÃO POR *Botrytis cinerea***

Devido ao crescimento insatisfatório das mudas de tomate no experimento de avaliação de aplicação do *Trichoderma* spp. via irrigação e arroz colonizado em substrato Tropstrato HT, foi proposto a execução de um ensaio *in vivo*, para a verificação do crescimento das plantas em substrato de outro fabricante.

O preparo do inóculo de *Trichoderma* spp. e das plantas foi executado da mesma maneira que a descrita anteriormente, porém foi utilizado o substrato comercial Vivatto Pro20 e foi realizada somente a inoculação com arroz colonizado neste experimento. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e após quatro semanas do transplante foi realizada a avaliação dos parâmetros biométricos: altura, diâmetro e massa seca da parte aérea.

Neste experimento também foi realizado o isolamento de ~~a incubação das~~ raízes de tomateiro em meio BDA após o período de avaliação, com o intuito de verificar se havia colonização eficaz do *Trichoderma* spp. ~~nestes órgãos~~. Para isso, as raízes foram coletadas dos vasos e lavadas com água de torneira e secas em papel filtro estéril. Logo após foram cortadas em pedaços de 4 mm e transferidas para placas de Petri contendo o meio BDA. O procedimento foi realizado ~~tanto~~ para os tratamentos e ~~quanto para o~~ controle. As placas foram incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas por sete dias, sendo então realizada a avaliação visual das placas.

Para o teste inicial de indução de resistência a *Botrytis cinerea*, foram coletados 3 trifólios, duas semanas após o transplante das mudas para os vasos. Para isso, algodão previamente autoclavado foi umedecido com água MilliQ autoclavada e enrolado em formato esférico, os trifólios foram espetados no algodão e colocados em placas de Petri

fornadas com papel filtro estéril e umedecido também por água MilliQ autoclavada. Discos de aproximadamente 2 mm de diâmetro foram repicados a partir da cultura de *Botrytis cinerea* crescida em BDA por 7 dias a 23°C em fotoperíodo de 12 horas. Os discos foram inoculados em uma das folhas do trifólio de tomateiro e as placas foram fechadas e incubadas a 23°C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias. A umidade no interior das placas foi observada e o papel filtro foi novamente embebecido de água MilliQ autoclavada quando necessário. Após o período de incubação, a severidade da doença foi avaliada através do percentual da área foliar afetada através do software Leaf Doctor (MEHMETOGLU e POPOV, 2012).

### **5.3.3 AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO COM *Trichoderma* spp. UTILIZANDO COMBINAÇÃO DOS SUBSTRATOS TROPSTRATO E VIVATTO EM DIFERENTES PROPORÇÕES**

Devido aos resultados do experimento de promoção de crescimento de tomateiro utilizando o substrato comercial Vivatto Pro20, foi realizado um novo experimento, desta vez, avaliando a mistura dos substratos em diferentes proporções para avaliar o crescimento das plantas. O preparo do inóculo de *Trichoderma* spp em arroz autoclavado e foi realizado da mesma maneira que a descrita anteriormente. Os tratamentos deste ensaio foram realizados através das seguintes proporções de substratos: 75% de Tropstrato e 25% de Vivatto; 50% de Tropstrato e 50% de Vivatto; 25% de Tropstrato e 75% de Vivatto. As misturas foram realizadas tendo como base o volume total do vaso de 500 mL. A infestação do substrato com *Trichoderma* spp. e a avaliação dos parâmetros biométricos foram realizadas como descrito nos experimentos anteriores.

### **5.3.4 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE *Trichoderma* spp NA EMERGÊNCIA DE MUDAS DE TOMATEIRO CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS**

Suspensões de  $10^5$  conídios/mL dos isolados 30/07 e 19/17 foram preparadas conforme descrito anteriormente. Sementes de tomate (Var. Santa Clara) foram semeadas em sementeiras de 40 alvéolos contendo substrato comercial Vivatto e Tropstrato, separadamente, e após semeadura, foi aplicado 1 mL da suspensão de conídio dos isolados de *Trichoderma* para cada alvéolo, para a testemunha foi utilizado 1 mL de água MilliQ autoclavada em cada alvéolo também em sementeiras com os dois tipos de substrato. As

sementeiras foram depositadas em fitocâmara com controle de fotoperíodo com 12 horas de luz e 12 horas sem luz a temperatura ambiente (24,3 °C) . A avaliação do ensaio se iniciou após 24 horas da semeadura e finalizou após 7 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros, baseados no trabalho de Carvalho e Carvalho ( 2009):

Tempo médio de emergência – TME

$$TME = \left( \sum n_i t_i \right) / \sum n_i$$

Em que:  $n_i$  = número de sementes que emergiram por dia;  $t_i$  = tempo de avaliação;  $i = 1$  para 7 dias.

Índice de velocidade de emergência – IVE

$$IVE = \sum (n_i | t_i)$$

Em que:  $n_i$  = número de sementes que emergiram no tempo  $i$ ;  $t_i$  = tempo após instalação do ensaio;  $i = 1$  para 7 dias. Unidade: adimensional

## 5.4 ENSAIO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

### 5.4.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE TOMATEIRO, TRATADAS COM *Trichoderma* spp. E CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS CONTRA A INFECCÃO DE *Fusarium oxysporum*.

Suspensões de  $10^5$  conídios/mL dos isolados 30/07 e 19/17 foram preparadas conforme descrito anteriormente. Sementes de tomate (Var. Santa Clara), foram semeadas em sementeiras de 128 alvéolos contendo substrato comercial Vivatto e Tropstrato, separadamente, e após semeadura, foi aplicado 1 mL da suspensão de conídio dos isolados de *Trichoderma* para cada alvéolo. Para a testemunha foi utilizado 1 mL de água MilliQ autoclavada em cada alvéolo também em sementeiras com os dois tipos de substrato separados.

O isolado de *F. oxysporum* foi cultivado em meio de cultura seletivo (NASH e SNYDER, 1991), em Erlenmeyer de 250 mL, sob temperatura de 25°C por 7 dias em agitação constante de 200 rpm. Após a incubação, a concentração do inóculo foi ajustada para  $2 \times 10^5$  conídios por mL, utilizando a câmara de Neubauer. O volume total de substrato

utilizado para esse ensaio foi depositado em bandejas de acrílico previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio. O inóculo de *F. oxysporum* foi diluído em água autoclavada de forma que pudesse irrigar e infestar o substrato de forma homogênea, revolvendo-se o substrato diversas vezes. As sementeiras foram mantidas em casa de vegetação e, após 25 dias, as mudas que emergiram foram transplantadas para vasos de polietileno com 500 mL de volume, 2 por vaso, sendo uma desbastada após uma semana. Cada vaso foi preenchido com o substrato específico, infestado previamente com o inóculo de *F. oxysporum*. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e após o aparecimento dos primeiros sintomas foi realizada a avaliação da severidade, através da escala diagramática (TOKESHI e GALLI, 1966):

Para sintomas externos:

1. Planta sem sintoma;
2. Planta com amarelecimento até a 2<sup>o</sup> folha;
3. Planta com amarelecimento até a 3<sup>o</sup> folha;
4. Planta murcha e sem amarelecimento;
5. Planta com murcha e amarelecimento;
6. Planta morta.

Para sintomas Internos:

1. Planta sem escurecimento dos vasos
2. Planta com escurecimento dos vasos até a altura da 1<sup>o</sup> folha;
3. Planta com escurecimento dos vasos até a altura da 2<sup>o</sup> folha;
4. Planta com escurecimento dos vasos até a altura da 3<sup>o</sup> folha;
5. Planta com escurecimento dos vasos até a metade do comprimento do caule;
6. Planta com escurecimento até próximo do ponteiro.

## 5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para o experimento de avaliação de aplicação de *Trichoderma* via irrigação e arroz colonizado foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial duplo (2x3); O ensaio de promoção de crescimento de tomateiro por *Trichoderma* utilizando o substrato comercial Vivatto e indução de resistência a *B. cinerea* e colonização de raízes foi adotado o delineamento inteiramente casualizado; No ensaio da avaliação da promoção de crescimento de tomateiro por *Trichoderma* spp. utilizando combinação dos substratos Tropstrato e Vivatto em diferentes proporções foi executado com o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial triplo (3x3). Para esses ensaios, foram utilizadas 5 repetições, 2 tratamentos (IB 19/17 e IB 30/07) e 1 testemunha. Para o esquema fatorial duplo (2x3) duas condições de aplicação e para o esquema fatorial triplo (3x3) 3 misturas de substratos.

Para o ensaio dos efeitos da aplicação de *Trichoderma* spp. na emergência de mudas de tomateiro cultivadas em diferentes substratos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 40 repetições para os cálculos de IVE e TME. Os tratamentos utilizados foram os mesmos do ensaio anterior.

Nos ensaios de indução de resistência foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições, sendo utilizados os mesmos tratamentos dos ensaios anteriores. Entretanto acrescentou-se uma testemunha de controle positivo sem a colonização do patógeno.

Todos os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ( $F \leq 0,05$ ) e as médias dos tratamentos foram comparadas entre si por meio do teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), onde utilizou-se software Agrostat online.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 ENSAIOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

#### 6.1.1 AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE *Trichoderma* spp. VIA IRRIGAÇÃO E ARROZ COLONIZADO

A análise de variância para a variável altura (Tabela 1, Figura 3) apresentou diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, tanto para as plantas que receberam a aplicação de *Trichoderma* spp. via arroz colonizado quanto via irrigação, sendo o tratamento 30/07

propiciando o maior tamanho das plantas, seguido do tratamento 19/17. Para a variável altura, a aplicação do tratamento 30/07 via irrigação obteve melhores resultados na altura das plantas do que via arroz colonizado. Para as testemunhas, não houve diferença estatística entre os fatores.

Para as variáveis diâmetro e massa seca das plantas, os tratamentos se diferenciaram da testemunha, mas não houve diferença estatística entre si, tanto para as plantas que receberam *Trichoderma* via arroz colonizado quanto para as que receberam via irrigação.

**Tabela 1.** Efeito do tratamento do substrato Tropstrato com isolados de *Trichoderma* spp., inoculados por duas vias, sobre o crescimento de plantas de tomate

Via de inoculação de <i>Trichoderma</i> spp.						
	Arroz colonizado	Irrigação	Arroz colonizado	Irrigação	Arroz colonizado	Irrigação
Isolados	Altura* (cm)		Diâmetro <sup>ns</sup> (mm)		Massa Seca <sup>ns</sup> (g)	
<b>30/07</b>	27,96 Aa	28,20 Aa	2,34 Aa	2,38 Aa	0,77 Aa	0,88 Aa
<b>19/17</b>	23,54 Ba	24,04 Ba	2,36 Aa	2,40 Aa	0,82 Aa	0,81 Aa
<b>Testemunha</b>	14,08 Ca	14,48 Ca	1,55 Ba	1,50 Ba	0,27 Ba	0,27 Ba
<b>CV (%)</b>	1,66		4,03		17,14	

\*Médias seguidas com letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas nas as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo.

**Tabela 2.** Efeito de *Trichoderma* spp. sobre as variáveis altura, diâmetro, massa seca e área lesionada por *Botrytis cinerea* em plantas de tomateiro cultivadas em substrato Vivatto

Isolado	Altura* (cm)	Diâmetro* (mm)	Massa Seca* (g)	Área lesionada (%)
<b>30/07</b>	49,28 b	5,74 b	3,54 b	0,2450 b
<b>19/17</b>	49,52 b	5,24 c	3,65 b	0,2565 b
<b>Testemunha</b>	62,04 a	6,77 a	6,03 a	0,5134 a
<b>CV (%)</b>	2,6	2,57	5,04	2,1

\*Médias seguidas com letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas nas as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo.



**Figura 3.** Efeito do tratamento dos isolados de *Trichoderma* spp., por duas vias de aplicação, sobre o crescimento de tomateiros cultivados em substrato Tropstrato.

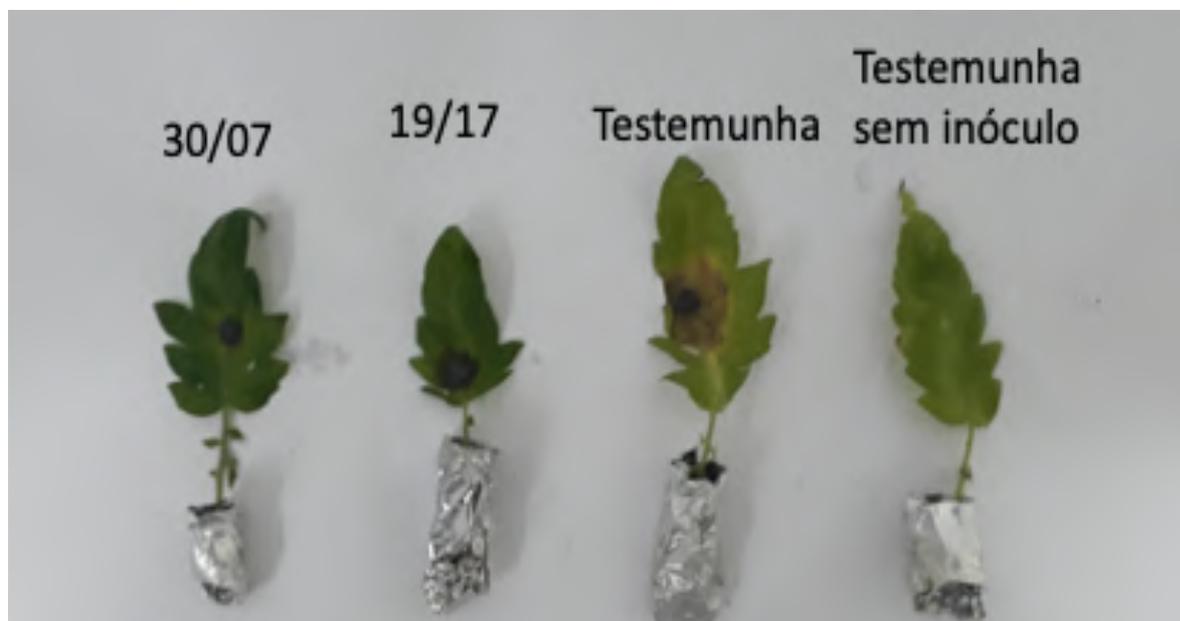
### 6.1.2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO POR *Trichoderma* spp UTILIZANDO O SUBSTRATO COMERCIAL VIVATTO, COLONIZAÇÃO DE RAÍZES E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À INFEÇÃO POR *Botrytis cinerea*

Para a variável altura (Tabela 2, Figura 4), não houve diferença estatística entre os tratamentos, mas os mesmos diferiram estatisticamente da testemunha, que apresentou a maior altura das plantas. O diâmetro das plantas apresentou diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha, sendo o maior diâmetro as plantas que não receberam nenhum tratamento com *Trichoderma* spp., seguido dos tratamentos 30/07 e 19/17, respectivamente. A variável massa seca das plantas não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, porém os mesmos diferiram estatisticamente da testemunha, que apresentou peso maior.

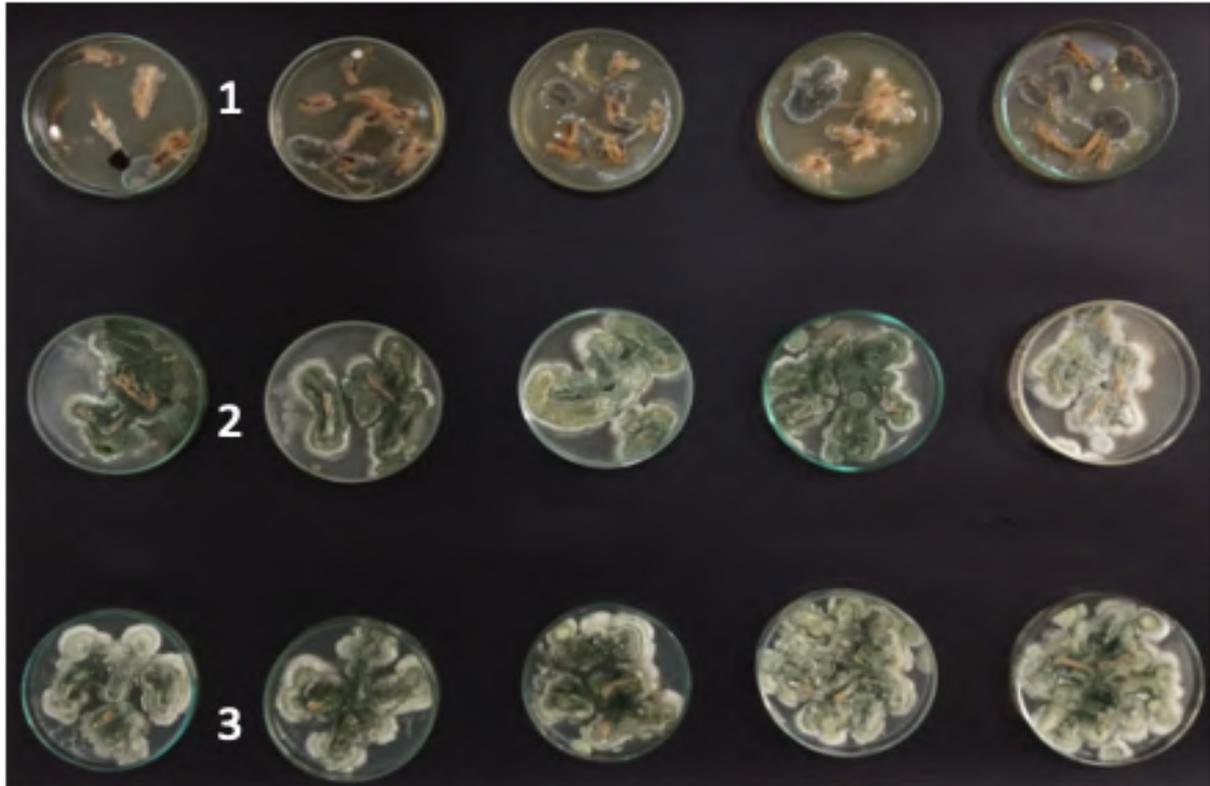
Para a área lesionada das folhas inoculadas com *Botrytis cinerea*, os tratamentos obtiveram a menor área lesionada, não diferindo estatisticamente entre si e a testemunha apresentou a maior área lesionada, diferindo estatisticamente dos tratamentos (Tabela 2, Figura 5). As placas de Petri com raízes das plantas (Figura 6) inoculadas com os tratamentos de *Trichoderma* spp., após 7 dias de incubação, apresentaram o crescimento de hifas com a coloração verde, enquanto as placas com as raízes da testemunha não apresentaram colonização por *Trichoderma* spp.



**Figura 4.** Efeito do tratamento dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de tomateiros cultivados em substrato Vivatto



**Figura 5.** Efeito de *Trichoderma* spp. sobre a indução da resistência de folhas de tomateiro contra ação de *Botrytis cinerea*.



**Figura 6.** Crescimento de *Trichoderma* spp. a partir das raízes de tomateiros tratados, incubados em meio BDA. Linha 1: Testemunha; Linha 2: isolado 19/17; Linha 3: isolado 30/07

### 6.1.3 AVALIAÇÃO DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE TOMATEIRO COM *Trichoderma* spp. UTILIZANDO COMBINAÇÃO DOS SUBSTRATOS TROPSTRATO E VIVATTO EM DIFERENTES PROPORÇÕES

Conforme esperado, de maneira geral, quanto maior a proporção de substrato Tropstrato na mistura, menor foi o desenvolvimento das plantas nos parâmetros de altura, diâmetro e massa seca (Tabela 3, Figura 5). Também foi observado um efeito negativo da inoculação com os isolados de *Trichoderma* spp. para os três parâmetros, com exceção da mistura de 50% de cada substrato.

**Tabela 3.** Efeito de *Trichoderma* spp. sobre as variáveis altura, diâmetro e massa seca das plantas de tomateiro, cultivadas em misturas de substratos Tropstrato e Vivatto com diferentes proporções

Proporção da mistura de substratos Tropstrato (T) + Vivatto (V)									
	75% T + 25% V	50% T + 50% V	25%T + 75% V	75% T + 25% V	50% T + 50% V	25%T + 75% V	75% T + 25% V	50% T + 50% V	25%T + 75% V
Isolado	Altura (cm)			Diâmetro (mm)			Massa Seca (g)		
<b>30/07</b>	17,72 Ac	28,96 Ab	32,43 Ba	1,89 Cb	3,46 Aa	3,83 Ba	2,10 Bc	3,01 Ab	3,25 Ba
<b>19/17</b>	17,68 Ac	27,24 Bb	34,52 Aa	2,50 Bb	3,43 Aa	3,81 Ba	2,20 Bc	2,99 Ab	3,32 Ba
<b>Testemunha</b>	18,02 Ac	28,56 Ab	34,14 Aa	3,04 Ac	3,99 Ab	4,84 Aa	2,61 Ac	3,06 Ab	3,64 Aa
<b>CV (%)</b>	3,16			7,32			7,91		

\*Médias seguidas com letras maiúsculas iguais nas colunas e minúsculas nas as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo.





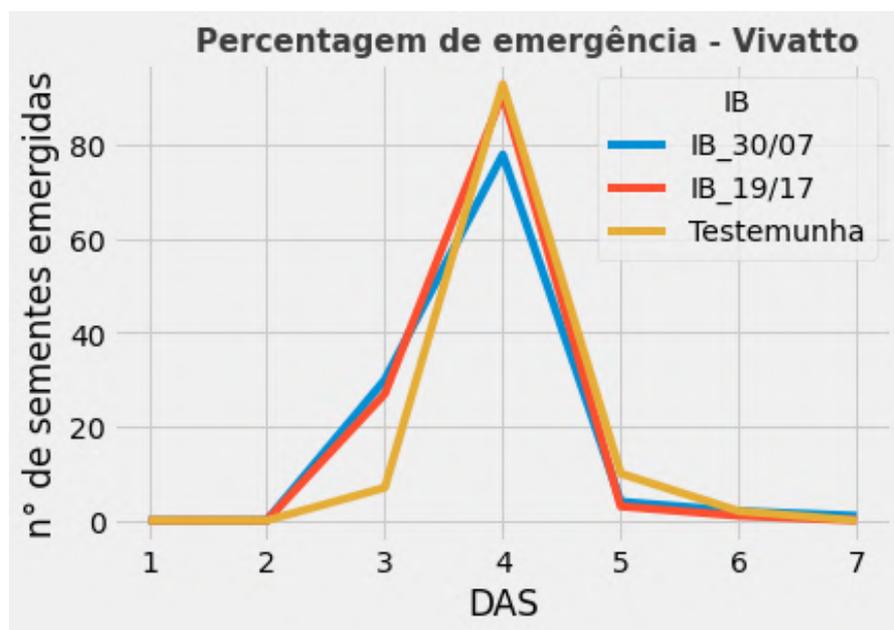
**Figura 7.** Efeito do tratamento dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre plantas de tomateiro cultivadas em misturas com diferentes proporções dos substratos Troostrato e Vivatto.

#### 6.1.4 EFEITOS DA APLICAÇÃO DE *Trichoderma* spp NA EMERGÊNCIA DE MUDAS DE TOMATEIRO CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS

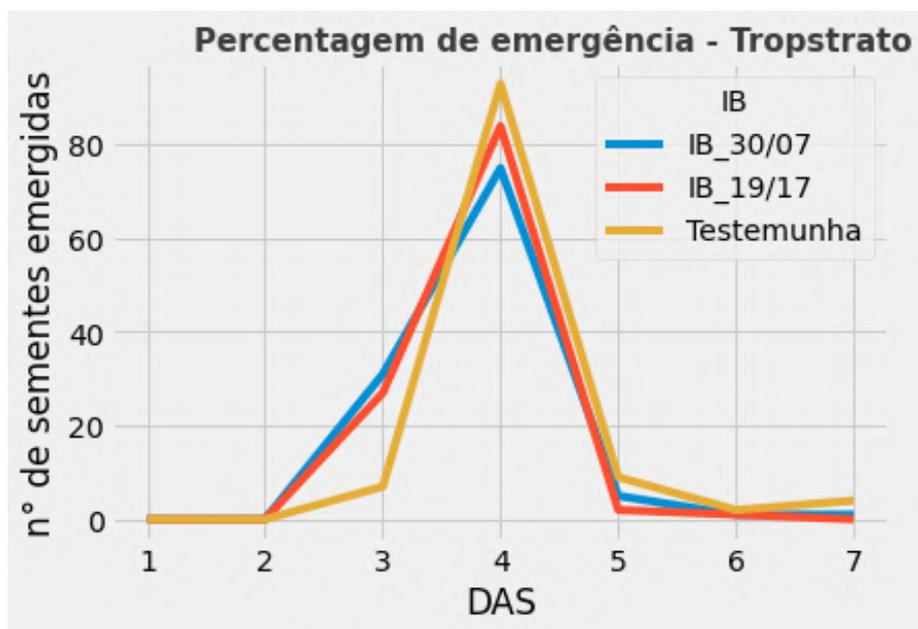
O comportamento da emergência das mudas de tomate, aconteceu de maneira semelhante para todos os tratamentos e para o controle nas duas condições de plantio. A emergência obteve maior densidade entre o 3° e 5° dia após a semeadura, tanto para o substrato Vivatto como para o Troostrato (Figuras 8 e 9). Houve um pequeno retardo de 1 dia para o início da emergência das mudas da testemunha.

Para a variável IVE, também não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha de nenhum dos substratos testados, foi observada pequena diferença na velocidade de emergência entre os tratamentos e a testemunha (Figuras 10 e 11). Para a variável TME, também não houve diferença significativa entre a aplicação dos tratamentos e a testemunha para nenhum dos substratos testados, todavia, a testemunha nos dois casos

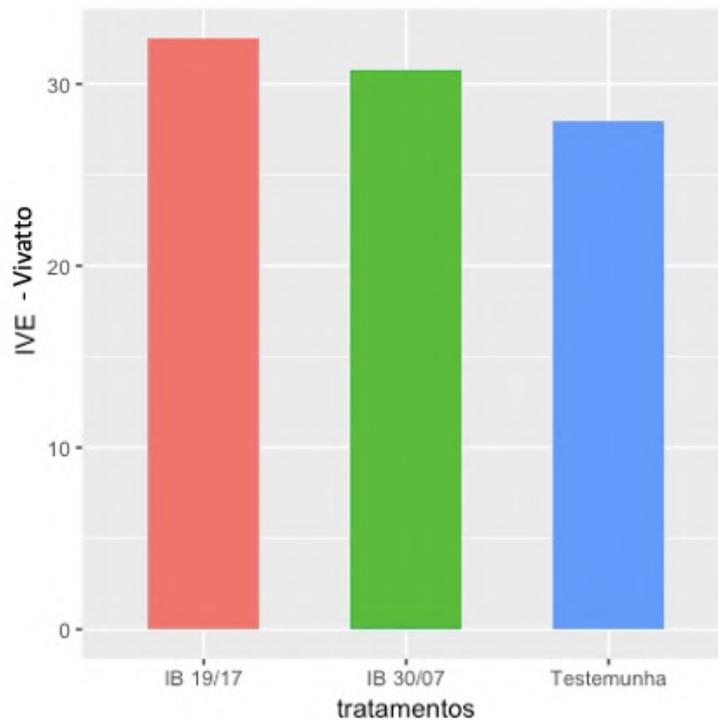
apresentou um pequeno aumento no tempo de emergência do que os tratamentos (Figura 12 e 13).



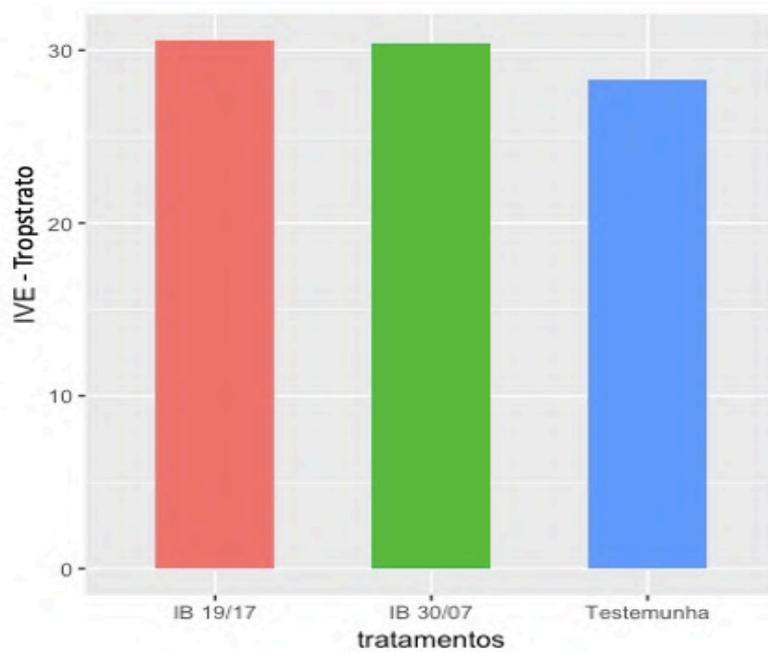
**Figura 8.** Percentagens de emergência das mudas de tomateiro através dos 7 dias após a semeadura – DAS, semeadas sob o substrato Vivatto.



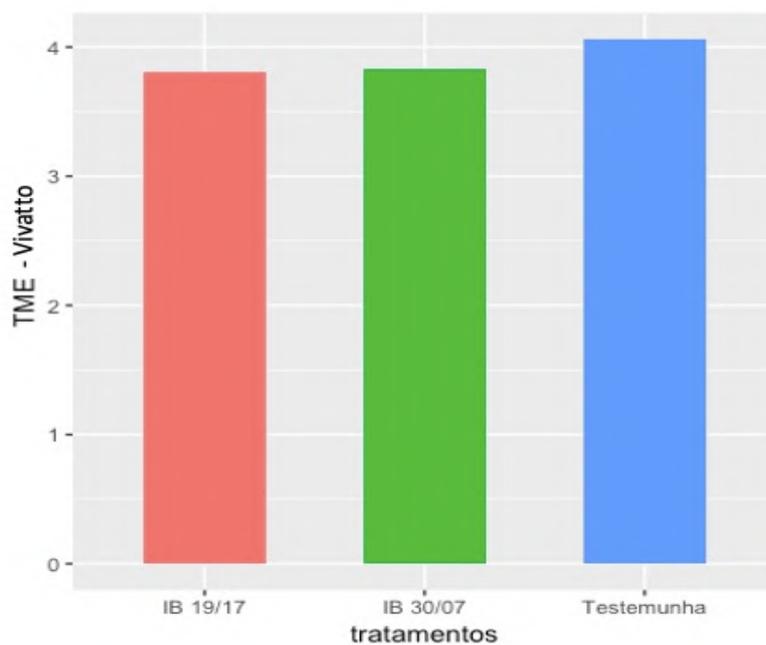
**Figura 9.** Percentagens de emergência das mudas de tomateiro através dos 7 dias após a semeadura – DAS, semeadas sob o substrato Vivatto.



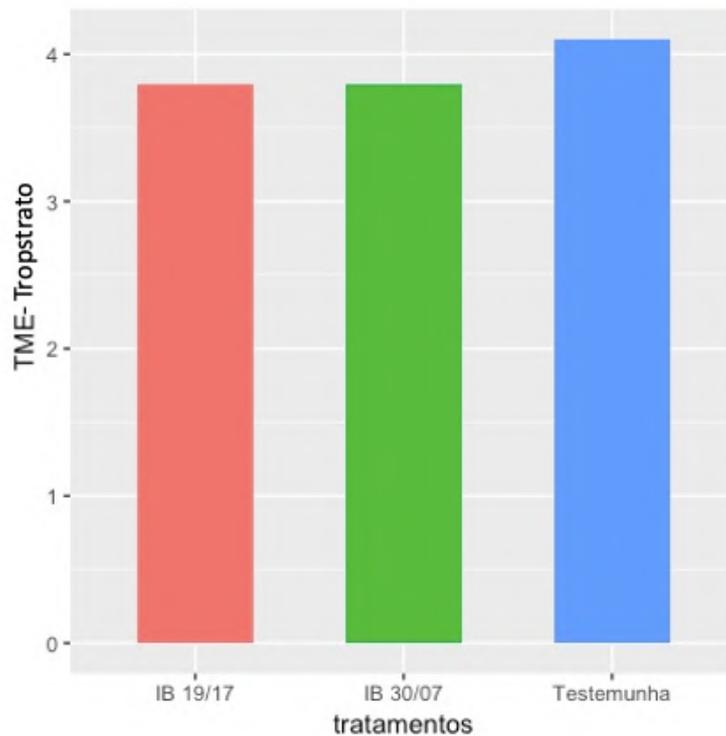
**Figura 10.** Índice de Velocidade de Emergência de mudas de tomateiro cultivadas sob o substrato Vivatto e inoculadas com *Trichoderma* spp.



**Figura 11.** Índice de Velocidade de Emergência de mudas de tomateiro cultivadas sob o substrato Tropstrato e inoculadas com *Trichoderma* spp.



**Figura 12.** Tempo Médio de Emergência de mudas de tomateiro cultivadas sob o substrato Vivatto e inoculadas com *Trichoderma* spp.



**Figura 13.** Tempo Médio de Emergência de mudas de tomateiro cultivadas sob o substrato Tropstrato e inoculadas com *Trichoderma* spp.

## 6.2 ENSAIO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

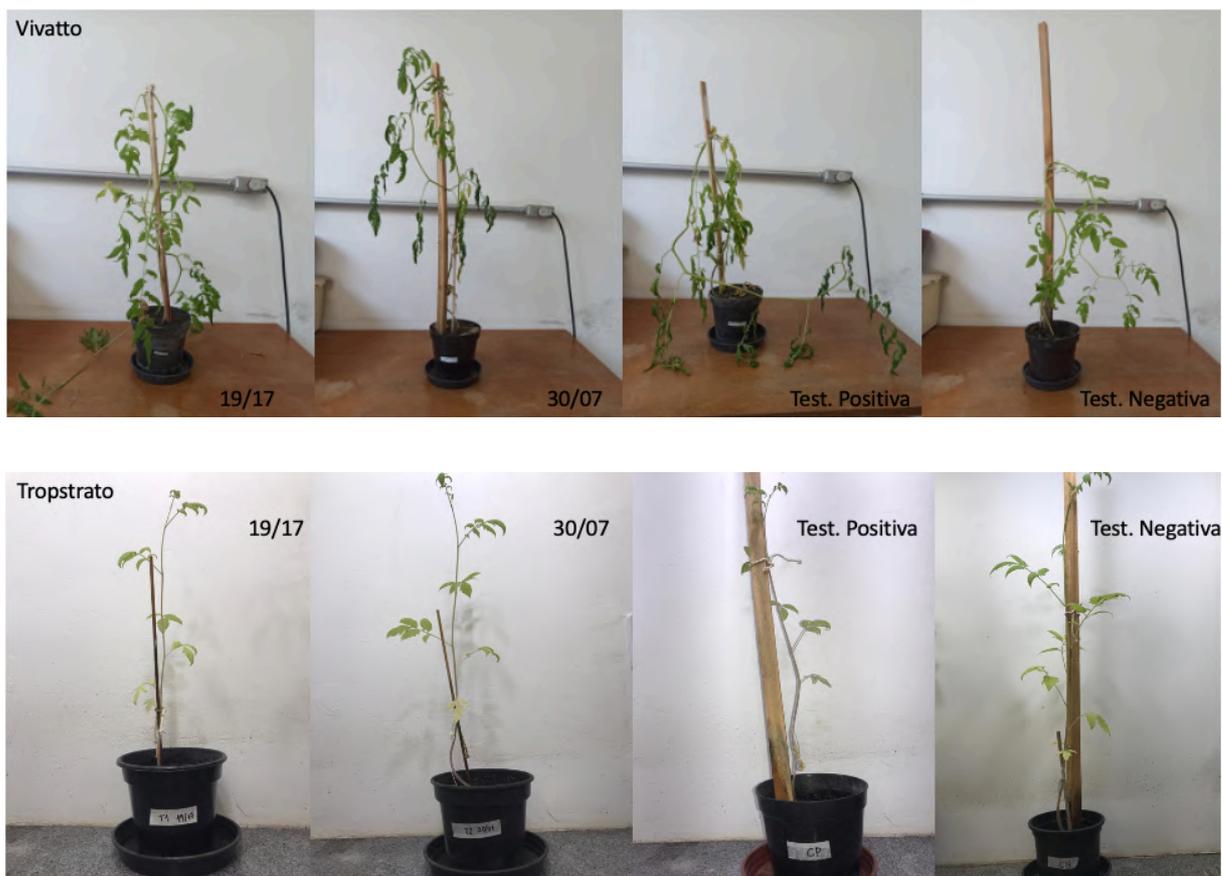
### 6.2.1 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS DE TOMATEIRO, TRATADAS COM *Trichoderma* spp. E CULTIVADAS EM DIFERENTES SUBSTRATOS CONTRA A INFECÇÃO DE *Fusarium oxysporum*.

A análise estatística da AACPD demonstrou que houve interação significativa entre os dois substratos, tendo as plantas cultivadas no substrato Vivatto apresentado severidade da doença maior quando comparadas àquelas cultivadas em substrato Tropstrato. Não houve efeito de diminuição da severidade da doença pelos tratamentos com *Trichoderma* spp. nas plantas cultivadas com os dois substratos comerciais. Os mesmos resultados foram observados na variável dos sintomas internos (Tabela 4, Figura 14).

**Tabela 4.** Efeito do tratamento de *Trichoderma* spp. na resistência de mudas de tomateiro, cultivadas em dois tipos de substrato, a fusariose (*Fusarium oxysporum*).

	Substratos Comerciais			
	Vivatto	Tropstrato	Vivatto	Tropstrato
<b>Isolados</b>	<b>AACPD**</b>		<b>Sintomas Internos**</b>	
<b>30/07</b>	127,60 Aa	44,40 Aa	56 Aa	26 Ba
<b>19/17</b>	121,40 Aa	47,80 Aa	54 Aa	24 Ba
<b>Testemunha positiva</b>	131,00 Aa	46,40 Aa	56 Aa	28 Ba
<b>Testemunha negativa</b>	34,00 Ab	34,00 Ab	10 Ab	10 Ab
<b>CV (%)</b>	2,64		12,9	

\*Médias seguidas com letras maiúsculas iguais entre colunas e minúsculas entre as linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; CV: coeficiente de variação; \*\*: interação significativa entre os fatores; AACPD: Cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença



**Figura 14.** Efeito do tratamento dos isolados de *Trichoderma* spp. sobre plantas de tomateiro cultivadas substratos (Tropstrato e Vivatto) infestados com *F. oxysporum*.

## 7. DISCUSSÃO

O cultivo agrícola convencional, onde há a diminuição da diversidade de plantas em um determinado ecossistema, causa um desequilíbrio principalmente no solo, fato já determinado em diversos estudos que apontam as consequências da monocultura e do uso exacerbado de fertilizantes e agroquímicos (GRASS *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017). O manejo agrícola no sistema convencional segue um padrão de técnicas muitas vezes voltado para aquelas ferramentas já consolidadas no uso, como é o caso da aplicação dos agroquímicos, do preparo do solo, irrigação e engenharia de plantio (KOBIEKSKI *et al.*, 2020; MELEHA *et al.*, 2020). Quando se trata de métodos voltados a agricultura orgânica ou um sistema de plantio que difere do convencional, os métodos de manejo, diversas vezes, necessitam serem reajustados e adaptados ao objetivo do determinado sistema de produção.

Em aplicações de produtos de controle biológico, o método de aplicação é um fator determinante para a eficácia desta ferramenta no uso agrícola, pois trata-se de organismos vivos que possuem modos de ação muitas vezes específicos para determinado problema fitossanitário. Uma demonstração importante do método de aplicação de produtos biológicos está no trabalho realizado por El-Mohamedy (2009), onde foram testados para o controle para a podridão da raiz (*F. oxysporum*) em mudas de *Citros* spp. , dois agentes de controle biológico (*T. harzianum* e *Bacillus subtilis*) e dois biocidas comerciais (Plant Guard e Rhizo-N). Neste trabalho experimentou-se 3 métodos de aplicação: a imersão das raízes das plantas em suspensão de água com inóculo de cada tratamento, o encharcamento do solo com os mesmos tratamentos e a junção dos dois métodos. Após a avaliação da severidade da doença, notou-se que os métodos utilizados em conjunto foram mais eficazes do que utilizados individualmente.

Explorar os métodos de aplicação de agentes de controle biológico é um pré-requisito para se obter sucesso em sua aplicação e tratando-se de experimentação agrícola para esses agentes. É uma pesquisa de base importante, para não se ter dúvidas se determinado método está causando efeitos não desejados e conseqüentemente mude a avaliação e análise dos dados. Estes foram os motivos principais da execução do ensaio de aplicação de *Trichoderma* spp. via irrigação ou via arroz colonizado. O método de utilização via arroz colonizado foi uma forma de multiplicação adotada por alguns motivos: custo baixo para produtores, praticidade, disponibilidade, rendimento, facilidade de esterilização e manutenção da cultura pura e facilidade de aplicação no campo (ANZANELLO e TEDESCO, 2020; CARVALHO FILHO *et al.*, 2008; FORTES *et al.*, 2007). Entretanto, sempre houve um ponto de discussão se aplicar arroz colonizado no solo, não fazia diferença no acúmulo de matéria orgânica na rizosfera e conseqüentemente afetaria a resposta da planta à aplicação do agente de controle biológico. Essa discussão trouxe algumas perguntas quando se trata de ensaios de promoção de crescimento. A matéria orgânica aplicada junto ao *Trichoderma* spp. estaria promovendo crescimento em ação conjunta com o mesmo, ou somente era a influência de um dos dois separados? Será que tal aplicação não estaria atrapalhando a planta em casos de experimentação com resultados negativos?

O ensaio apresentou respostas para alguns destes questionamentos, a primeira foi esclarecida com a diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha para os dois métodos de aplicação, ou seja: as variáveis de altura, diâmetro e massa seca foram maiores para todas as plantas tratadas com *Trichoderma* spp. Não houve diferença significativa nos dois métodos de aplicação testados. Desta forma, os mesmos não influenciaram no efeito do

*Trichoderma* spp. nas plantas de tomateiro. Não houve diferença estatística entre as testemunhas dos dois métodos, onde no método via irrigação foi aplicado apenas água estéril e no via arroz colonizado, apenas arroz estéril, o que faz com que seja possível desconsiderar uma possível interferência da utilização do arroz colonizado, tanto sozinho quanto em conjunto com o agente de controle biológico (Tabela 1, Figura 3).

Após análise dos dados do experimento de comparação dos métodos de aplicação, é possível concluir que houve promoção de crescimento das plantas de tomateiro após a aplicação de *Trichoderma* spp. Entretanto, as plantas não apresentaram um desenvolvimento adequado. As variedades de crescimento indeterminado, como é o caso da var. Santa Clara, se cultivadas em um manejo adequado, podem atingir no geral uma produção de massa seca maior do que a apresentada pelas plantas no ensaio da avaliação dos testes de aplicação, como é possível observar no trabalho de Malia *et al.*, (2015), no qual a var. Santa Clara destacou-se como um rendimento comercial alto por hectare, se comparada a outras de crescimento indeterminado como Nagai, Montese e San Vitu. A utilização do substrato comercial Tropstrato foi determinada a partir dos trabalhos realizados no grupo de pesquisa em controle biológico, da ULRBMA a partir de um experimento (NOGUEIRA, 2011) executado com diferentes substratos comerciais e isolados de *Trichoderma* spp. , onde o substrato comercial Tropstrato destacou-se por melhor adaptar o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. e conseqüentemente promover o crescimento das mudas de pepineiro (*Cucumis sativus*). Desta forma, foi possível concluir que este substrato não foi favorável ao desenvolvimento normal da cultura do tomateiro, o que levou a execução de um novo experimento com um substrato comercial alternativo.

No experimento de promoção de crescimento com o substrato Vivatto, as variáveis observadas demonstraram um comportamento de crescimento contrário ao do experimento anterior. A altura, diâmetro e massa seca das plantas tratadas com *Trichoderma* spp. apresentaram valores menores em relação àquelas que não receberam o tratamento (testemunha). O comportamento que se espera de um agente de controle biológico é que sempre haverá benefícios para as plantas após o tratamento. Todavia, em situações em que o ambiente já é favorável para a cultura os resultados podem ser contrários. Essa observação não é tão divulgada quando se trata de falar sobre controle biológico, mas já é comum em alguns estudos, como é o caso da revisão sobre o tema escrita por Lorito *et al.* (2010), que citam que os agentes de controle biológico são selecionados em meio a comunidades microbianas muito diversas, com testes laboratoriais e de campo, o que faz com que sejam selecionadas cepas de elite que expressam mecanismos de ação favoráveis a agricultura.

Entretanto, mesmo após uma seleção de agentes microbianos eficazes, muitos isolados somente causam benefícios na interação com as plantas em situação de estresse, e não em condições ideais de cultivo, ou podem expressar determinado mecanismo de ação que atua frente a um único problema e afeta a produção final da safra. É importante observar que mesmo não tendo sido observada promoção de crescimento nas plantas tratadas com *Trichoderma* spp. (Tabela 2 e Figura 4), esses fungos colonizaram as raízes (Figura 6) e causaram redução na área foliar lesionada por *B. cinerea* no teste de indução de resistência (Tabela 2 e Figura 5).

De acordo com Morales-Cedeño *et al.*, (2021), , nem todas as cepas de *Trichoderma* são capazes de promover o crescimento de plantas, tornando a pesquisa de base e a seleção de linhagens, fatores importantíssimos para o sucesso do controle biológico. Em um estudo realizado com nove cepas de *Trichoderma* spp., no qual foram identificados compostos voláteis capazes de promover crescimento, observou-se resultados interessantes sobre a forma de promoção de crescimento de cada espécie. Voláteis produzidos por *T. pseudokoningii* foram capazes de aumentar o crescimento de plantas de *Arabidopsis thaliana*, enquanto uma cepa de *T. atroviride* diminuiu em cerca de 50,5% do crescimento e 13,1% da produção de clorofila. Neste estudo, os autores classificaram as cepas em promotoras, neutras e negativas. Através da identificação dos voláteis, observaram que espécies que produzem 2H-piran-2-ona promoveriam crescimento das plantas, o que mais uma vez torna importante o conhecimento da informação genética desses microrganismos para entender seu modo de ação (LEE, S. *et al.*, 2016).

O entendimento sobre os mecanismos de ação dos agentes de controle biológico é necessário para direcionamento do manejo agrícola, e isso pode ser influenciado também de acordo com a interação entre o microrganismo e a planta e essa especificidade pode definir como recomendar esse agente. Como exemplo, um trabalho realizado na cultura do milho (*Zea mays*) (HARMAN *et al.*, 2004) relatou o comportamento da interação entre um isolado de *T. harzianum* (T22) em diferentes situações com a cultura e a rizosfera. Os autores constataram primeiramente que o tratamento das plantas de milho com *Trichoderma* resultou no aumento do tamanho das raízes, mas não da parte aérea. Em um segundo ensaio foi testado o efeito do tratamento de T22 em um solo tratado com Mefenoxam, fungicida sistêmico recomendado para o controle de doenças do solo causadas por *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. Percebeu-se que o tratamento com o T22 promoveu crescimento nas plantas em solo tratado ou não com o fungicida. Neste trabalho também se testou a capacidade de se induzir resistência nas plantas de milho para o controle *P. ultimum* e

antracnose, causada por *Colletotrichum graminicola*. Observou-se que o tratamento foi eficaz aumentando a atividade de algumas enzimas ligadas a proteção da planta.

Estudo mostrou resultados semelhantes na cultura do tomateiro, onde duas cepas de elite de *T. atroviride* e *T. harzianum* tiveram seus mecanismos de ação afetados pelas diferenças genéticas entre linhagens de tomateiro selvagem e domesticado. Os autores comprovaram que a resposta para a promoção de crescimento das plantas e para a infecção de *B. cinerea* da linha M82 tratadas com as cepas não foi positiva e teve efeito prejudicial, mas em outras linhas o tratamento com *Trichoderma* spp. teve efeito benéfico, via ativação de um mecanismo de priming nas plantas. Também sugeriram que a capacidade das plantas de se beneficiarem da interação com o agente de controle biológico pode ser melhorada geneticamente (TUCCI *et al.*, 2011). É possível enxergar a especificidade da interação desses fungos com as plantas de uma maneira complexa. Há uma escassez de informações sobre os efeitos diversos que um agente de controle biológico pode ter com a planta e o ambiente em que os dois se encontram. A maioria dos autores não publica resultados negativos ou ao se depararem com efeitos diferentes daqueles almejados, descartam os dados e não seguem uma investigação mais aprofundada sobre a situação.

A partir deste entendimento, foram planejados novos experimentos para tentar explorar ainda mais os efeitos dos isolados de *Trichoderma* spp. nas plantas de tomateiro em diferentes situações que não foram testadas anteriormente. Foi proposto um terceiro experimento de promoção de crescimento, desta vez utilizando a mistura dos substratos Vivatto e Tropstrato. O propósito deste ensaio era encontrar uma combinação de substratos que permitisse tanto o bom desenvolvimento da planta como a observação da promoção de crescimento pelo fungo. O resultado do experimento mostrou que, mesmo na mistura com a menor proporção do substrato Vivatto, não foi possível observar o efeito da aplicação de *Trichoderma* na promoção de crescimento.

Para a avaliação do *Trichoderma* como indutor de resistência sistêmica nas plantas, é sempre necessário a aplicação do agente de controle biológico com intervalo de tempo seguro em relação a infecção com um fitopatógeno, para que o microrganismo consiga ativar as defesas da planta. Desta forma, consegue-se ter certeza de que o fungo não está ativando algum mecanismo de ação próprio e tendo um efeito curativo na situação. Foi proposto por causa deste quesito, a aplicação dos isolados de *Trichoderma* via irrigação na semeadura, e avaliação da emergência das mudas, para somente depois avaliar a indução de resistência à infecção por *F. oxysporum*. Observou-se que para os dois isolados testados, não houve respostas significativas para as variáveis analisadas (IVE e TME), tanto nas sementes

semeadas no substrato Tropstrato, quanto para aquelas cultivadas no substrato Vivatto. A diferença na velocidade de emergência após 7 dias de avaliação entre os tratamentos não foi significativa, não havendo influência da aplicação de *Trichoderma* positiva ou negativa neste quesito. É importante salientar que ao observar os gráficos de emergência (Figura 8 e 9), é possível constatar uma maior velocidade na emergência das mudas tratadas com *Trichoderma* spp. até o terceiro dia de avaliação, após isso a percentagem de emergência das mudas que não receberam o tratamento se iguala aquelas que receberam.

O tratamento de sementes utilizando agentes de controle biológico é uma técnica já implementada (CHANDRIKA, PRASAD e GODBOLE, 2019; CONINCK *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2020), que pode ser utilizada em diversas estratégias de manejo. Mas, alguns aspectos devem ser considerados, como a composição do solo onde o fungo será aplicado junto a semente e a população de microrganismos deste solo, que podem influenciar na eficácia deste tratamento. Nos estudos de Machado *et al.*, (2015), os autores chegaram à conclusão que a emergência de sementes de Cambará (*Gochnatia polymorpha*), tratadas com *Trichoderma* foi mais rápida no substrato estéril do que no substrato não estéril possivelmente por uma inibição de patógenos habitantes da espermosfera. A execução de todos os experimentos *in vivo* foi realizada com substratos não estéreis, com o objetivo de simular uma situação real na produção de mudas de tomateiro. Desta forma, é um ponto de investigação importante, talvez para o futuro, entender se há diferença na composição da comunidade biológica do solo utilizado, e se isso influencia na emergência das mudas tratadas com o fungo. Aliado a este fato, encontra-se também informações sobre o potencial de predação e parasitismo dos isolados 30/07 e 19/17 já mencionados em trabalhos publicados utilizando a coleção de *Trichoderma* spp da ULRBMA em diversos patossistemas, o que eleva a possibilidade de o *Trichoderma* ter um efeito mais protetor que indutor de crescimento quando trata-se da aplicação na semente.

Essa mesma linha de investigação pode ser utilizada para analisar os resultados do ensaio de indução de resistência a *F. oxysporum*, os resultados demonstraram que não houve efeito de redução da severidade da doença nas plantas tratadas com *Trichoderma*, para nenhum dos dois substratos utilizados. Os valores de AACPD e sintomas internos foram os mesmos para as plantas tratadas e para a testemunha que recebeu somente a infecção com o fungo fitopatogênico, diferindo apenas da testemunha que não foi tratada e não foi inoculada com o *F. oxysporum*. Entretanto, é possível observar que nas plantas cultivadas no substrato Vivatto a severidade da doença atingiu valores maiores comparada com as plantas no substrato Tropstrato, para as duas variáveis analisadas. Neste sentido seria necessário

investigar se o efeito do *Trichoderma* para o tratamento desta doença não seria eficaz de uma forma curativa, ou seja, aplicando o agente de biocontrole com a doença já estabelecida e não em uma tentativa de induzir resistência a partir de uma aplicação previa.

Resultados de efeitos curativos de *Trichoderma* podem ser observados em um trabalho realizado em tomate para o controle da mancha *F. oxysporum*. Um isolado de *T. asperellum* foi multiplicado em restos orgânicos de farelo de arroz, biochar, cachos vazios de frutas, fibra de coco, solo superficial e solo misto, com intuito de avaliar a influência do substrato na eficácia no fungo. A fibra de coco foi o substrato que mais influenciou a esporulação do isolado de *Trichoderma* e quando testado contra a murcha de *Fusarium* foi capaz de reduzir a severidade da doença. Os autores focaram na ação de biocontrole do *Trichoderma* pois a persistência do patógeno no solo dificulta o controle da doença (HASAN *et al.*, 2020).

## 8. CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* IB-19/17 e 30/07 foram capazes de promover crescimento nas plantas de tomateiro quando as plantas foram cultivadas utilizando o substrato Tropstrato;

Os efeitos dos isolados de *Trichoderma* sob as plantas pode não ser positivo, e isso está diretamente ligado com a interação que o microrganismo cria com a planta e o solo;

O tratamento de sementes utilizando os isolados de *Trichoderma* parece ter um efeito mais protetor do que influenciar na velocidade de emergência das mudas, o que precisa ser melhor investigado;

Nos primeiros testes de controle biológico, o tratamento com os isolados de *Trichoderma* conseguiram diminuir a severidade da doença causada por *B. cinerea*, ativando mecanismos de indução de resistência de folhas destacadas das plantas de tomateiro;

Para o experimento com *F. oxysporum*, não foi possível observar em plantas em vasos redução da severidade da doença através da indução de resistência;

As plantas cultivadas sob o substrato Vivatto obtiveram níveis de severidade da doença mais elevados do que do que aquelas cultivadas com substrato Tropstrato, para a infecção causada por *F. oxysporum*.

## CAPÍTULO 2 – SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS DE *Trichoderma camerunense* (IB 30/07) E *Trichoderma lentiforme* (IB 19/17) UTILIZANDO A TECNOLOGIA NANOPORE E A PLATAFORMA NEXTSEQ.

### 9. INTRODUÇÃO

As ferramentas de sequenciamento de DNA apresentaram grande evolução nas últimas décadas. Os métodos de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiram o sequenciamento de genomas em larga escala, estando disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information) os genomas completos de diversas espécies de fungos do gênero *Trichoderma*. O sequenciamento de genomas gera uma enorme quantidade de dados, tornando a montagem e a interpretação destas informações um óbice. Entretanto, a existência de genomas de referência de espécies próximas facilita estas tarefas assim como permite a realização de análises comparativas que levam à identificação de mecanismos e modos de ação comuns. A comparação de genomas de espécies de *Trichoderma* tem contribuído para responder questionamentos acerca de sua evolução e de seu papel ecológico (DRUZHININA, SHELEST e KUBICEK, 2012; KUBICEK *et al.*, 2011; SCHMOLL *et al.*, 2016).

Com o surgimento de uma terceira geração de sequenciadores, como é o caso do MinION da Oxford Nanopore, a execução do sequenciamento de genomas completos tornou-se ainda mais prática e eficaz (BOWDEN *et al.*, 2019; GOLDSTEIN *et al.*, 2018; TYLER *et al.*, 2018). Todavia, o método exige que haja um cuidado na extração do DNA, de forma que se mantenha a integridade do DNA para que sequências longas sejam obtidas durante o sequenciamento.

Em vista do exposto, o presente estudo propôs sequenciar os genomas de dois isolados da coleção de *Trichoderma* pertencente a Unidade de Referência em Biologia Molecular Aplica – URBMA, do Instituto Biológico de São Paulo: IB 30/07 (*T. lentiforme*) e IB 19/17 (*T. camerunense*). Ambos pertencem ao complexo de espécies *T. harzianum* e apresentaram bom desempenho na promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas em estudos anteriores. Por conseguinte, foi necessário também, a testagem de métodos de extração de DNA que permitissem a obtenção de DNA genômico de qualidade e com pouca fragmentação. O sequenciamento do genoma, bem como os resultados de estudos anteriores com esses isolados, promoverá melhor entendimento sobre os mecanismos, tanto por parte do fungo como por parte da planta, envolvidos na promoção de crescimento e proteção de plantas a patógenos. Com base nesses conhecimentos, novos isolados de *Trichoderma* spp mais eficazes poderão ser encontrados por métodos de seleção

direcionados às características desejadas. Futuras manipulações genéticas por transgenia ou CRISPR/Cas também serão facilitadas.

## 10. MATERIAL E METODOS

### 10.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para dar início ao sequenciamento do genoma, os isolados 30/07 e 19/17 foram repicados a partir dos tubos de ensaio em 100 mL de meio BD líquido, o material foi incubado a 28° C por 48 horas sob agitação constante a 180 rpm. Após este período, os micélios foram filtrados e triturados com pistilos em microtubos sob nitrogênio líquido. Foram avaliados três protocolos de extração de DNA genômico: Protocolo com o reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) e Wizard Genomic DNA Purification kit (PROMEGA). O protocolo com CTAB foi repetido acrescentando-se RNase. Para analisar a qualidade da extração, o DNA genômico foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio e analisado quanto a pureza no aparelho Nanodrop.

### 10.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PELO METODO CTAB MODIFICADO

Devido aos resultados dos testes anteriores, foi proposto a modificação do protocolo de extração CTAB (MURRAY e THOMPSON, 1980), com o intuito de melhorar a qualidade do DNA genômico e preservar a molécula para o sequenciamento, desta forma foram realizadas as seguintes modificações:

#### EXTRAÇÃO DE DNA – CTAB (modificado)

1. Retirar uma porção do micélio do meio de cultura e depositar em microtubo;
2. **\*Fazer duplicatas de todas as amostras;**
3. **\*Depositar nitrogênio líquido e realizar a trituração dentro do microtubo com pistilo plástico;**
4. Acrescentar 600 µL de tampão de extração CTAB e triturar novamente;
5. Acrescenta 1 µL de RNase A (4 mg/mL);
6. Incubar as amostras sob agitação a 65°C por 30 minutos;

7. **\*Após incubação, juntar o conteúdo dos tubos em duplicata em um único para concentrar o DNA, realizar o procedimento com os microtubos no gelo;**
8. **\*Adicionar 600 µL de clorofórmio -álcool isoamílico (24:1), mas não agitar em vortex, mas sim inverter o microtubo levemente com as mãos;**
9. Centrifugar a 14.000 G por 10 minutos;
10. Transferir 500 µL da fase aquosa para um microtubo novo;
11. **\*Adicionar 0,6 volumes de isopropanol (300 µL), mas não agitar vigorosamente, mas sim inverter o microtubo levemente com as mãos;**
12. **\*Depositar os microtubos a -16°C por 60 minutos para aumentar a precipitação, pode ser utilizado um freezer comum;**
13. **\*Centrifugar a 15.000 G na temperatura de 4°C por 10 minutos;**
14. Descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet;
15. Lavar o pellet com 500 µL de etanol 70% gelado e misturar por inversão levemente com as mãos;
16. **\*Centrifugar novamente a 15.000 G na temperatura de 4°C por 10 minutos;**
17. **Descartar o sobrenadante com cuidado para não perder o pellet;**
18. **\*Secar as amostras em papel filtro somente em temperatura ambiente;**
19. Ressuspender o pellet com 50 µL de água MiliQ estéril
20. O DNA está pronto para o sequenciamento.

\*= Partes do protocolo modificadas ou acrescentadas.

Para analisar a qualidade da extração, o DNA genômico foi submetido a análise de pureza no aparelho Nanodrop.

### 10.3 SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANOTAÇÃO DOS GENOMAS

O DNA foi sequenciado utilizando o Ligation Sequencing Kit SQK-LSK109 (Oxford Nanopore Technologies). A concentração do DNA foi verificada em aparelho Nanodrop e em fluorímetro Quantifluor (Promega). Um micrograma do DNA genômico em um volume de 47 µL de H<sub>2</sub>O foi submetido às reações de reparo das extremidades e ligação de adaptador seguindo as instruções do kit e com as enzimas e tampões do NEBNext Companion Module for Oxford Nanopore Technologies Ligation Sequencing.

A reação de reparo foi realizada com o NEBNext FFPE DNA Repair Mix e Ultra II End-prep enzyme mix. As reações foram levadas ao termociclador a 20°C por 5 minutos e

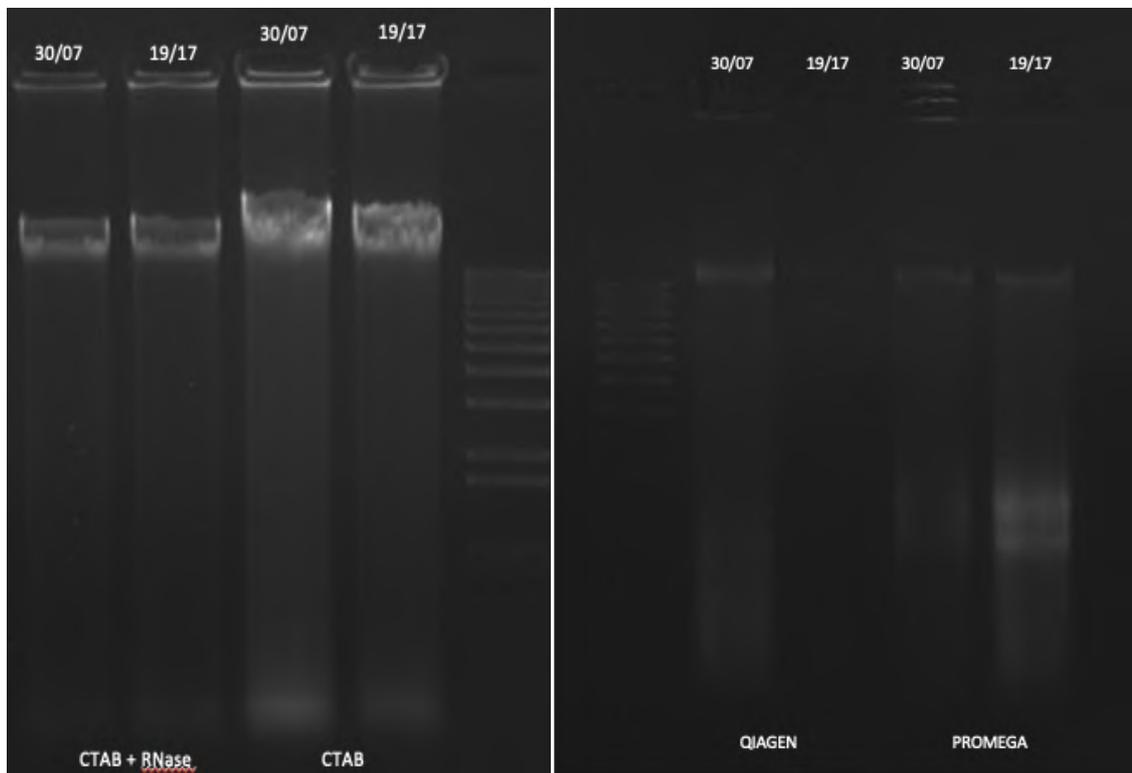
posteriormente a 65°C por mais 5 minutos, para serem preparadas para adicionar os adaptadores. As amostras foram depositadas em tubos max recovery, com o intuito do material genético não ficar retido na parede do tubo. O produto da reação foi purificado com 60 µL de Ampure XP (microesferas magnéticas) e foi realizada uma mistura do conteúdo do tubo devagar. As amostras foram levadas a centrífuga por alguns segundos para o spin down, após isso os tubos foram mantidos na rack magnética, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi lavada com etanol 70%. Após essa etapa as amostras foram ressuspensas em 15 µL do reagente EB e incubadas a 37°C, posteriormente foram novamente levadas para a rack magnética onde foi removido 15 µL do conteúdo dos tubos. O DNA foi novamente quantificado e foi montada a solução dos adaptadores, sendo composta por DNA: 60 µL, LNB: 25 µL, NEBNext: 10 µL, Adapter mix: 5 µL. Total = 100 µL. Os passos de lavagem foram repetidos e a amostra quantificada novamente. Para a aplicação das amostras no aparelho de sequenciamento (MinION) foi realizada uma solução com a mistura dos reagentes SQB, LB e FLT, e posteriormente os tubos foram levados a centrífuga para o spin down. No MinION foi realizada a checagem dos poços, após encaixar a flow cell e foi aplicado a solução de Priming para realizar o sequenciamento (NANOPORE PROTOCOL, 2017). A aquisição dos dados e o “basecalling” foram realizados em tempo real com o programa MinKNOW. O sequenciamento foi realizado por 24 h. As sequências Nanopore foram montadas inicialmente utilizando o programa Flye v.2.9 (KOLMOGOROV *et al.*, 2019), empregando a plataforma Galaxy Project (usegalaxy.org e usegalaxy.eu)

Como complemento para o sequenciamento, o DNA dos isolados foi sequenciado em pares 2 x 100 bp utilizando a plataforma NextSeq (Illumina TM) na NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP). As sequências foram mapeadas nos contigs obtidos previamente com o programa Flye, utilizando o programa BWA-MEM (Burrow-Wheeler Aligner – Maximal Exact Matches) v.0.7.17 (LI, 2013). Toda a montagem foi submetida ao polimento com o programa Pilon v1.20 (WALKER *et al.*, 2014), a qualidade da montagem foi avaliada pelo programa BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) v.5.3.2 (MANNI *et al.*, 2021). A anotação foi realizada utilizando o programa Funannotate v.1.8.1 (PALMER e STAJICH, 2022) e eggNOG Mapper v2 (CANTALAPIEDRA *et al.*, 2021). O resultado da análise com o eggNOG foi traduzida com as informações disponíveis no banco de dados do NCBI para genes ortólogos. Todo o processo foi realizado na plataforma Galaxy Project.

## 11. RESULTADOS

### 11.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Foi obtido DNA genômico de boa qualidade dos isolados de *Trichoderma* spp. empregando-se os métodos de CTAB e DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) (Figura 6). O tratamento, com RNase, do DNA extraído pelo método do CTAB melhorou sua qualidade (Figuras 12 e 13). O Wizard Genomic DNA Kit (Promega) não resultou em DNA de boa qualidade. A concentração do DNA extraído foi maior quando utilizado o método do CTAB (Figura 13).



**Figura 12.** Verificação da qualidade do DNA genômico extraído pelos métodos CTAB, CTAB+ RNase, DNeasy (Qiagen) e Wizard (Promega). Eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídeo.



**Figura 13.** Avaliação da concentração e qualidade do DNA extraído pelos diferentes métodos, em aparelho Nanodrop. A1: 30/07 - Wizard, B1: 19/17- Wizard; C1: 30/07 – DNeasy, D1: 19/17-DNeasy; E1: 30/07- CTAB+ RNase, F1: 19/17-CTAB+RNas. A taxa de absorção 260/280 indica a contaminação por proteínas, quando  $>$  ou  $=$  a 1,8 indica uma amostra de DNA pura, quando  $<$  que 1,8 indica contaminação por compostos orgânicos ou agentes caotrópicos.

## 11.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PELO METODO CTAB MODIFICADO

A modificação e adição de cuidados a extração de DNA pelo método CTAB, resultou numa melhor qualidade do DNA e melhor preservação da molécula, resultando em fragmentos maiores (Tabela 4).

**Tabela 4.** Avaliação da concentração e qualidade do DNA extraído

Isolado	Concentração
IB-19/17	260/280 = 2,05
	260/230 = 2,06
IB-30/07	260/280 = 2,06
	260/230 = 2,22

### 11.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENOMAS

#### 11.3.1 OXFORD NANOPORE

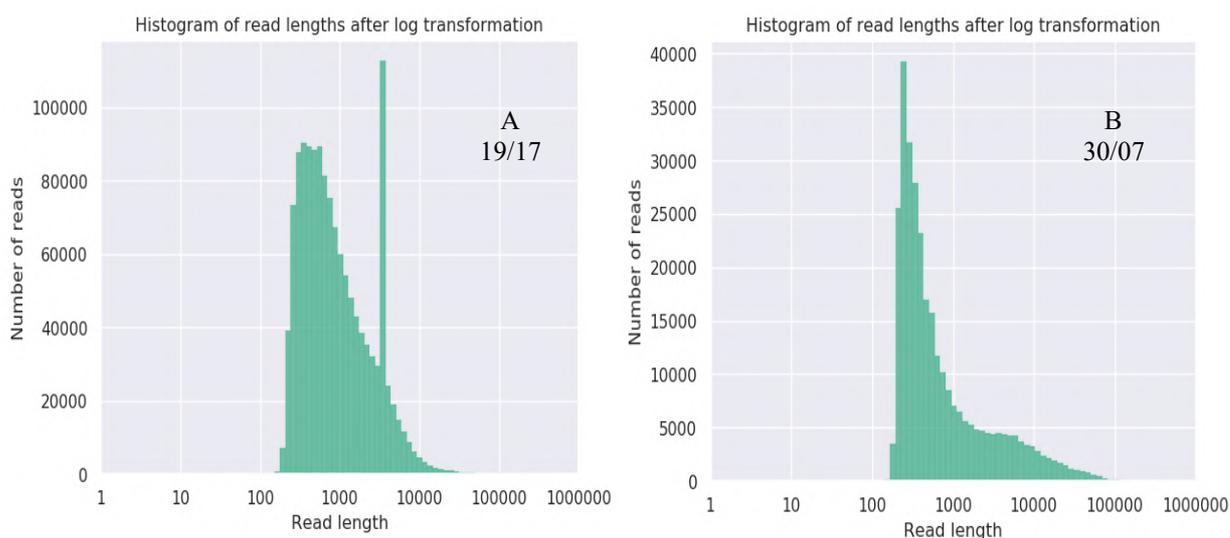
As análises quantitativas e qualitativas dos dados de sequenciamento no equipamento MinION para os isolados 19/17 e 30/07, foram realizadas com o programa Nanoplot (Tabela 5).

**Tabela 5.** Análise quantitativa e qualitativa dos resultados de sequenciamento dos genomas dos isolados de *T. camerunense* 19/17 e *T. lentiforme* 30/07 na plataforma MinION.

Isolados	19/17	30/07
Tamanho médio das sequências (bases)	1.582,4	2.599,9
Qualidade média das sequências	9,8	9,9
Número total de sequências	1.344.000	302.843
Total de bases	2.126.683.868	787.373.186
Qualidade das sequências		
>Q5	1.344.000 (100,0%) 2.126,7Mb	302.843 (100,0%) 787,4Mb
>Q7	1.344.000 (100,0%) 2.126,7Mb	302.843 (100,0%) 787,4Mb
>Q10	614.253 (45,7%) 1048,0Mb	148.166 (48,9%) 405,9Mb
>Q12	38.962 (2,9%) 44,1Mb	16.328 (5,4%) 23,0Mb
>Q15	38 (0,0%) 0,0Mb	129 (0,0%) 0,4Mb
Cinco sequências mais longas e qualidade média		
1	169.070 (8,1)	246.950 (8,1)
2	133.422 (10,0)	193.404 (10,9)
3	126.760 (9,2)	178.981 (11,7)
4	116.197 (11,2)	176.237 (10,9)
5	116.086 (8,5)	165.416 (10,0)

O sequenciamento do isolado 19/17 resultou em maior número de sequências (1.344.000) com um total de 2.126,7 Mb, em comparação com o isolado 30/07, que resultou em 302.843 sequências com 787,4 Mb (Tabela 5). Por outro lado, os dados do isolado 30/07 apresentaram qualidade ligeiramente superior e sequências mais longas.

Através do programa Nanoplot também foi analisada a quantidade de sequências obtidas de acordo com o tamanho das sequências (Figura 14). Apesar do menor número total de sequências obtidas para o isolado 30/07, percebe-se pelo histograma uma proporção um pouco maior de sequências acima de 1.000 bases. O número elevado de sequências de tamanho aproximado de 3,6 Kb observado nos dados do isolado 19/17 corresponde às leituras do DNA do fago lambda utilizado como controle interno. No sequenciamento do isolado 30/07, este controle não foi utilizado.



**Figura 14.** Histograma da distribuição das sequências de acordo com o tamanho, para *T. camerunense* 19/17 (A) e *T. lentiforme* 30/07 (B).

### 11.2.3 ILLUMINA

O sequenciamento complementar na plataforma NextSeq (Illumina) resultou em 4996262 sequências totais para o isolado 19/17 e 5664591 para o 30/07. Para ambos os isolados o tamanho das sequências está em um intervalo de 35-101 bases, e um percentual de 48% para bases Guanina e Citosina (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análise quantitativa e qualitativa dos resultados de sequenciamento dos genomas dos isolados de *T. camerunense* 19/17 e *T. lentiforme* 30/07 na plataforma Miseq (Illumina).

<b>Isolados</b>	<b>19/17</b>	<b>30.07</b>
Sequências totais	4996262	5664591
Sequências de baixa qualidade	0	0
Tamanho das sequências	35-101	35-101
%GC	48	48

GC= Percentagem de Guanina e citosina

### 11.2.3 MONTAGEM DO GENOMA

Os genomas foram montados com o programa Flye resultando em 11 contigs para o isolado 30/07 e 36 contigs para o isolado 19/17, total de 39,05 e 39,91 Mb (Tabelas 7 e 8).

**Tabela 7.** Montagem do genoma de *T. lentiforme* 30/07 pelo program Flye 2.6

<b><i>T. lentiforme</i> 30/07</b>	tamanho	cobertura	circular	repetições
contig_3	8882769	18	N	N
contig_2	7581718	18	N	N
contig_5	6256819	19	N	N
contig_6	4351638	18	N	N
contig_4	4275829	18	N	N
contig_7	3926946	18	N	N
contig_1	2241732	18	N	N
contig_8	1505100	18	N	N
contig_15	27701	635	Y	Y
contig_11	5451	5	N	Y
contig_13	4073	14	N	N
genoma total	39.059.776			

**Tabela 8.** Montagem do genoma de *T. camerunense* 19/17 pelo programa Flye 2.6

<b><i>T. camerunense</i> 19/17</b>	tamanho	cobertura	circular	repetições
contig_33	5182532	41	N	N
contig_2	4829435	41	N	N
contig_27	4801852	41	N	N
contig_13	3455283	41	N	N
contig_6	3249481	42	N	N
contig_46	3206105	42	N	N

contig_35	2692331	41	N	N
contig_20	2620277	41	N	N
contig_8	2329196	41	N	N
contig_42	1835989	40	N	N
contig_22	1490614	42	N	N
contig_28	1370836	41	N	N
contig_34	817808	41	N	N
contig_66	257279	41	N	N
contig_54	184888	38	N	N
contig_98	109636	37	N	N
contig_75	65639	15	N	N
contig_102	64816	41	N	N
contig_78	42623	21	N	N
contig_100	32256	35	N	Y
contig_48	28747	125	N	Y
contig_97	28746	359	N	Y
contig_76	27792	21	N	N
contig_95	27234	21	N	Y
contig_67	9817	34	N	N
contig_59	7148	11	N	Y
contig_25	4541	20	N	Y
contig_99	4244	29	N	Y
contig_19	2791	15	N	Y
contig_41	2501	18	N	Y
contig_14	2472	15	N	Y
contig_50	2085	29	N	N
contig_83	1218	15	N	Y
contig_49	1042	1072	N	Y
contig_63	799	499	N	N
contig_45	623	8	N	Y
<hr/>				
genoma total	38.813.064			

#### 11.2.4 POLIMENTO DO GENOMA APÓS MONTAGEM

Após o polimento da montagem do genoma com o programa Pilon, o genoma total do isolado 30/07 apresentou 39.183.747 nt, com a exclusão da mitocôndria e 38.874.616 nt para o isolado 19/17, com a exclusão da mitocôndria e sequências do fago lambda, este último utilizado como controle interno somente no sequenciamento do isolado 19/17 (Tabelas 9 e 10)

**Tabela 9.** Polimento da anotação do genoma com o programa Pilon para o isolado 30/07

<i>T. lentiforme</i> 30/07	tamanho	
contig_3	8.919.297	
contig_2	7.610.925	
contig_5	6.282.435	
contig_6	4.367.921	
contig_4	4.292.299	
contig_7	3.941.592	
contig_1	2.249.479	
contig_8	1.510.166	
contig_15	27.801	mitocôndria
contig_11	5.486	
contig_13	4.147	
genoma total	39.183.747	

**Tabela 10.** Polimento da anotação do genoma com o programa Pilon para o isolado 19/17

<i>T. camerunense</i> 19/17	Tamanho
contig_33	5.200.296
contig_2	4.845.893
contig_27	4.817.338
contig_13	3.466.263
contig_6	3.259.792
contig_46	3.216.473
contig_35	2.700.309
contig_20	2.628.348
contig_8	2.336.196
contig_42	1.841.786
contig_22	1.494.651
contig_28	1.375.056
contig_34	819.970
contig_66	258.379
contig_54	185.406
contig_98	109.884
contig_75	66.132
contig_102	65.002
contig_78	42.631

contig_100	32.486	
contig_48	28.817	mitocôndria
contig_97	27.899	
contig_76	27.470	
contig_95	22.592	
contig_67	9.834	
contig_59	7.146	
contig_25	4.544	
contig_99	4.269	
contig_19	2.792	
contig_41	2.503	
contig_14	2.475	
contig_50	2.085	Fago Lambda
contig_83	1.218	Fago Lambda
contig_49	1.043	mitocôndria
contig_63	801	
contig_45	623	Fago Lambda
<b>genoma total</b>	<b>38.874.616</b>	

### 11.2.5 QUALIDADE DO GENOMA APÓS MONTAGEM

A análise BUSCO mostrou que 94.6% e 95.8% dos 4.494 genes conservados da família Hypocreales de fungos, apresentavam-se completos nos genomas dos isolados 30/07 e 19/17, respectivamente. Dentro destes valores, 94.3% e 95.5%, são genes com cópias únicas e 0.3% são genes com cópias duplicadas, para os isolados 30/07 e 19/17, respectivamente. O software também identificou 2.6% e 1.8% de genes fragmentados e 2.8% e 2.4% de genes ausentes, para os isolados 30/07 e 19/17 respectivamente (Tabela 11).

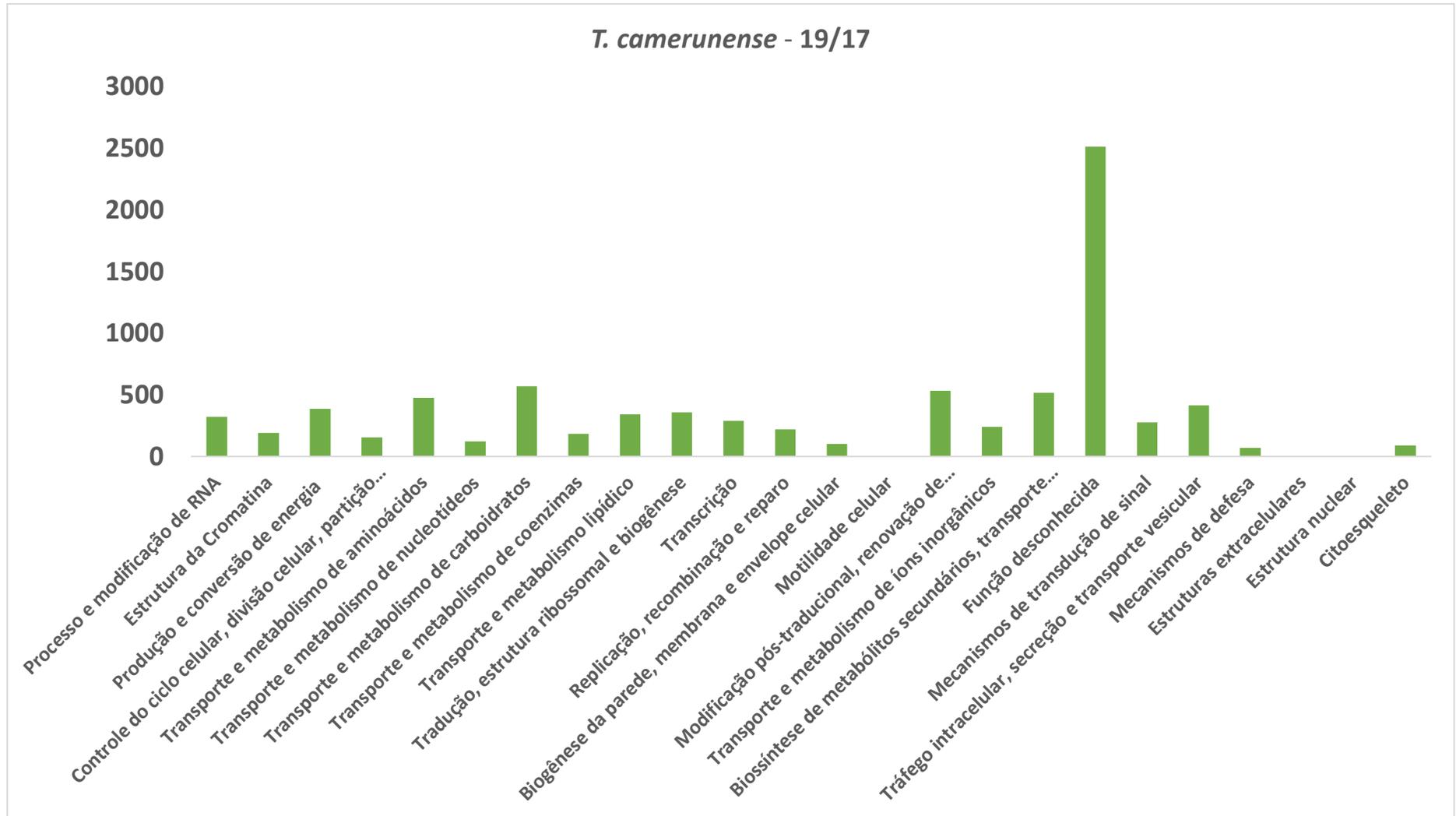
**Tabela 11.** Análise da qualidade do genoma dos isolados 30/07 e 19/17 após montagem pelo software BUSCO.

<b>Parâmetros</b>	<b>30/07</b>	<b>19/17</b>
<b>Completos</b>	4249 (94.6%)	4304 (95.8%)
<b>Completos de cópias únicas</b>	4236 (94.3%)	4291 (95.5%)
<b>Completos e duplicados</b>	13 (0.3%)	13 (0.3%)
<b>Fragmentados</b>	117 (2.6%)	83 (1.8%)
<b>Ausentes</b>	128 (2.8%)	107 (2.4%)
<b>Total grupos BUSCO</b>	<b>4494</b>	<b>4494</b>

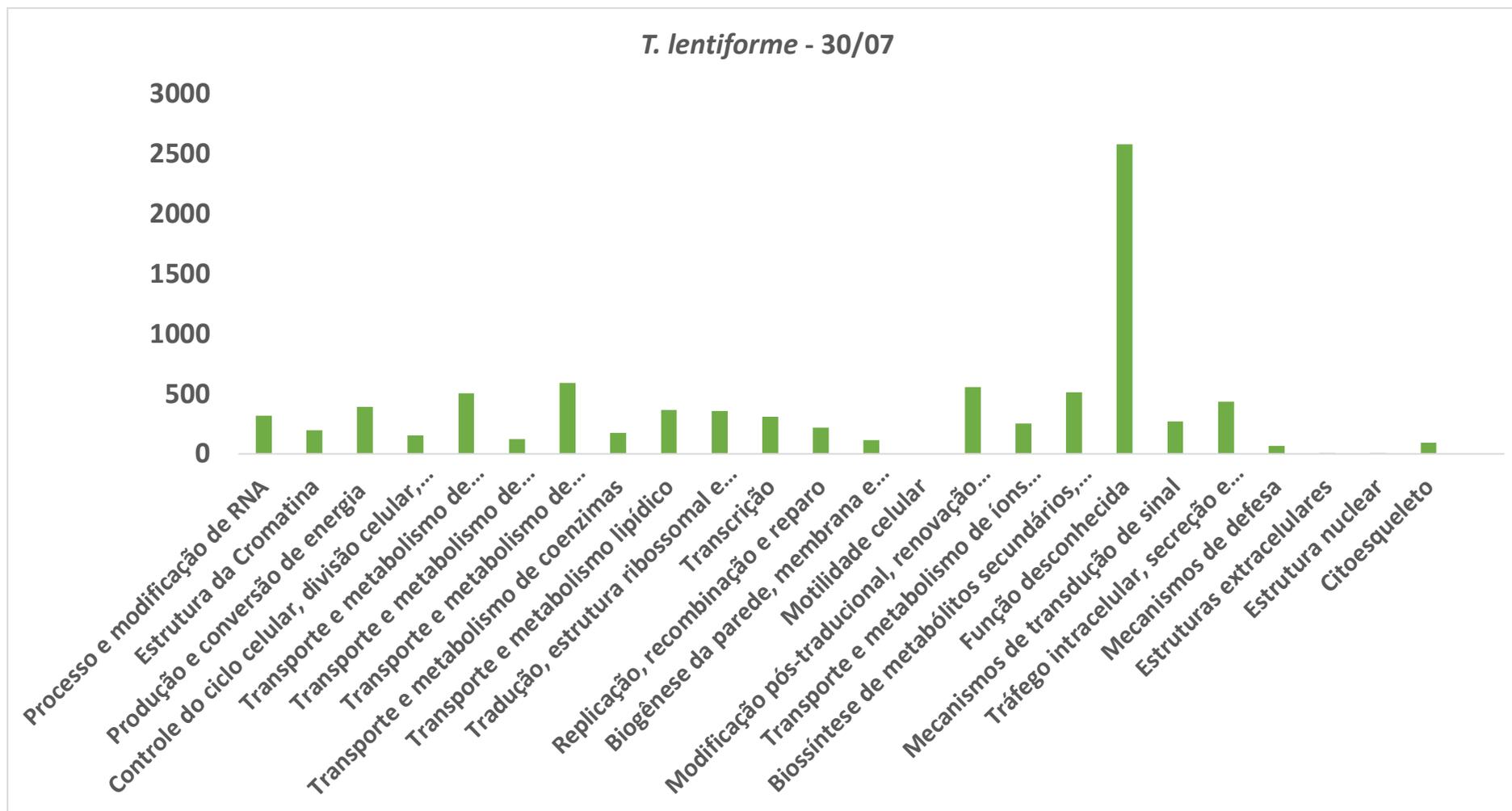
### 11.2.6 ANOTAÇÃO DO GENOMA

A análise da anotação funcional dos genes para os isolados de *Trichoderma* spp., processada pelo software Funannotate, resultou em um total de 9813 genes codificadores de proteínas para o isolado 19/17 e 10045 para o isolado 30/07. Esta análise foi cruzada com três bancos de dados de conteúdo geral: o banco de dados de famílias de proteínas – Pfam; o banco de dados de agrupamentos de genes ortólogos (COG) e o banco de dados de enzimas ativas em carboidratos – CAZymes.

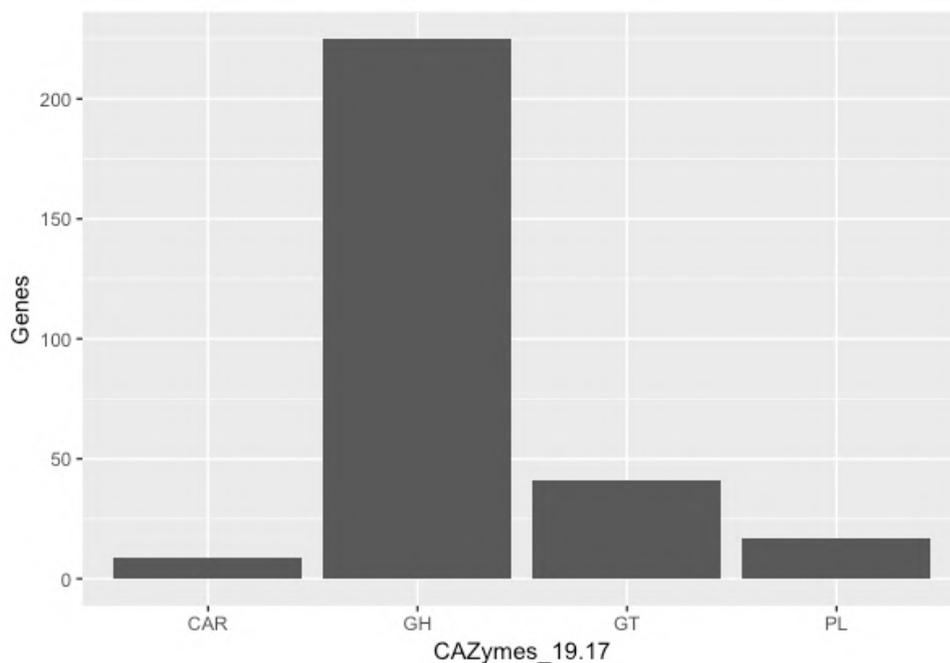
Pelo Pfam, foram encontradas as famílias de 8233 das proteínas do isolado 19/17 e de 8454 do 30/07. Pela análise com o programa eggNOG, foi possível realizar a identificação funcional dos genes consultados e classificá-los em 24 categorias (Figuras 15 e 16). A análise baseada no banco de dados CAZymes, resultou em quatro agrupamentos de genes que codificam essas enzimas (Figura 17 e 18). Adicionalmente, foi possível identificar genes codificadores de enzimas dos tipos PKS (polyketide synthase – policetídeo sintase) e NRPS (nonribosomal peptide synthetase – peptídeo não-ribossomal sintetase) envolvidas na síntese metabólitos secundários com potencial ação antimicrobiana (Figura 19 e 20).



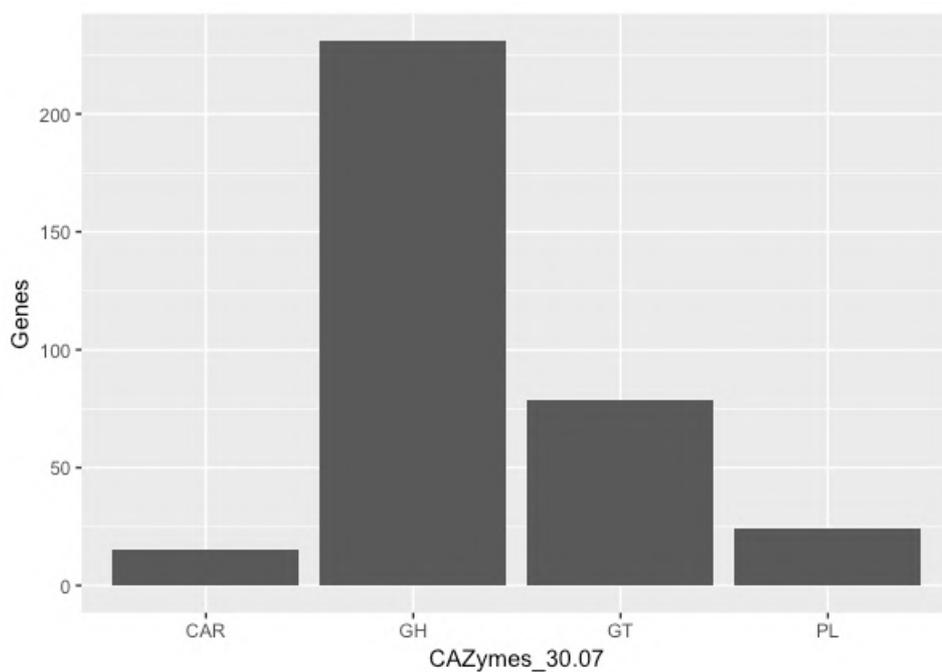
**Figura 15.** Distribuição do número de genes de acordo com as categorias para genes ortólogos do NCBI para *T. camerunense* 19/17.



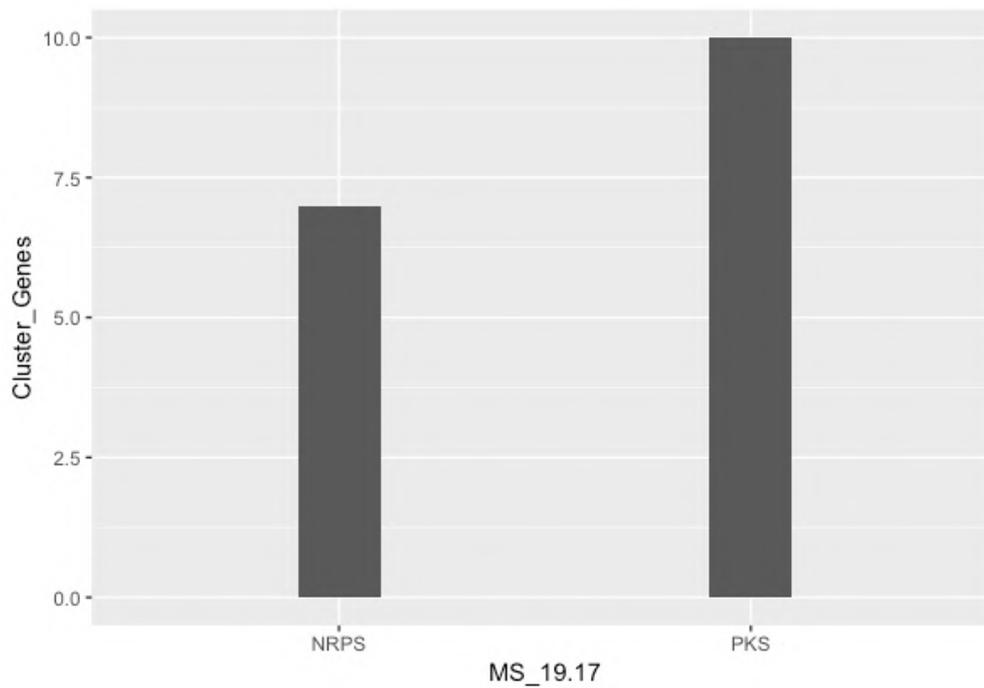
**Figura 16.** Distribuição do número de genes de acordo com as categorias para genes ortólogos do NCBI para *T. lentiforme* 30/07.



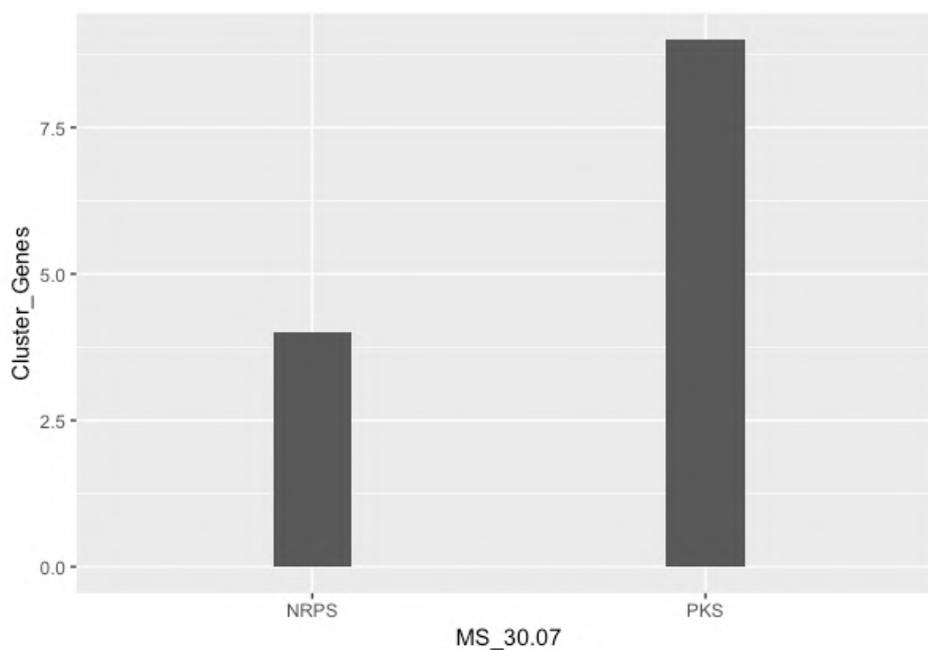
**Figura 17.** Análise da quantidade de enzimas ativas em carboidratos – CAZymes após anotação do genoma para o isolado 19/17 - *T. camerunense*, CAR: carboidrato esterases, GH: glicosil hidrolases, GT: glicosil transferases e PL: polissacarídeos liases .



**Figura 18.** Análise da quantidade de enzimas ativas em carboidratos – CAZymes após anotação do genoma para o isolado 30/07 - *T. lentiforme*. CAR: carboidrato esterases, GH: glicosil hidrolases, GT: glicosil transferases e PL: polissacarídeos liases .



**Figura 19.** Análise da quantidade de genes que codificam metabólitos secundários - MS após anotação do genoma para o isolado 19/17 - *T. camerunense*. NRPS: peptídeo não-ribossomal sintetase e PKS: policetídeo sintase.



**Figura 20.** Análise da quantidade de genes que codificam metabólitos secundários - MS após anotação do genoma para o isolado 30/07 - *T. lentiforme*. NRPS: peptídeo não-ribossomal sintetase e PKS: policetídeo sintase.

## 12 DISCUSSÃO

A comparação dos diferentes métodos de extração de DNA genômico evidenciou que o método do CTAB associado ao tratamento com RNase resultou em material de boa qualidade para o sequenciamento de nova geração. O método CTAB é descrito como preferido na utilização das rotinas de laboratórios de microbiologia, para rápida extração de DNA e utilização na reação de PCR, principalmente na identificação de patógenos dos alimentos e de espécies vegetais. A principal justificativa é a fácil adaptação aos laboratórios, velocidade, sensibilidade e custo benefício (UMESHA, MANUKUMAR e RAGHAVA, 2016).

Outra característica importante deste método de extração, é a fácil adaptação da metodologia para um objetivo específico. É comum encontrar trabalhos que demonstram que o método de extração CTAB pode sofrer alterações sem comprometer a qualidade da extração. É o caso de uma adaptação com o objetivo da extração de DNA de sementes de plantas de culturas variadas, pertencentes a sete ordens diferentes, neste trabalho foi elevada a concentração CTAB e maiores níveis de 2-β-mercaptoetanol, também foram adicionadas concentrações mais elevadas de cloreto de sódio e acetato e potássio, simultaneamente no passo de lavagem com isopropanol. As modificações resultaram em uma extração livre de polissacarídeos, polifenóis e outros metabolitos secundários (ABOUL-MAATY e ORABY, 2019). O CTAB também foi empregado na extração de DNA de microrganismos, no caso específico de fungos, com o mesmo objetivo de remoção de polissacarídeos que influenciam na concentração e pureza do ácido nucléico, em um experimento que testou a adição de Polietilenoglicol – PEG – 8000 durante a precipitação do DNA de culturas de *Schizophyllum commune*. Os autores concluíram que a modificação apresentou uma alta integridade, com fragmentos de tamanho de 30 kb, concentração superior a 100 ng/μL e rendimento superior a 30 μg/g (HUANG *et al.*, 2018).

Com o advento dos sequenciamentos de terceira geração, como é o caso do MinION da Oxford Nanopore, houve um grande avanço na praticidade de se obter sequências e em curto tempo, já que esses métodos praticamente extinguiram as etapas de produção de bibliotecas por amplificação, previamente ao sequenciamento. Entretanto, para se gerar leituras longas, como é o caso do sequenciamento de genomas completos, é necessário a obtenção de DNA livre de impurezas e com alto peso molecular. A testagem dos diferentes métodos, demonstrou que o CTAB modificado é eficiente para este objetivo, principalmente

quando se trata de redução dos custos do projeto e por ser um método já rotineiramente aplicado na URLBMA. É possível encontrar na literatura, trabalhos que utilizaram o método CTAB-modificado para a obtenção de sequências ultralongas, tanto para fungos (JONES *et al.*, 2019; PURUSHOTHAM *et al.*, 2020) quanto para plantas (VAILLANCOURT e BUELL, 2019; VILANOVA *et al.*, 2020).

Os tamanhos dos genomas obtidos pelas montagens híbridas Nanopore + Illumina estão dentro da faixa reportada para espécies de *Trichoderma* do clado Harzianum/Virens, que varia de 38,8 Mb a 40,9 Mb (KUBICEK *et al.*, 2019). A montagem obtida para o isolado 30/07 resultou em um dos contigs com 27.801 nt, circular, com elevada cobertura e a do genoma do isolado 19/17 resultou em um dos contigs com 28.817 nt, circular, que o Blastn mostrou corresponderem aos genomas mitocondriais. muito próximo aos tamanhos dos genoma mitocondriais de *T. harzianum* CBS 226.95 (27.632 nt) e *T. lixii* MUT 3171 (29.971 nt). Apesar dos graus de cobertura relativamente baixos, principalmente para o isolado 30/07, as sequências ultralongas obtidas pela plataforma MinION permitiram a montagem dos genomas em contigs longos (Tabelas 9 e 10). Mesmo com uma cobertura menor para o isolado 30/07, a obtenção de sequências, em média, de tamanhos maiores, resultou em menor número de contigs (10, excluindo o mitocondrial), próximo ao número de 7 cromossomos descrito para outras espécies do gênero (CHUNG *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2021)

Quando se trata de genômica de *Trichoderma* spp., é possível encontrar nos últimos dois anos trabalhos que utilizam a tecnologia Nanopore para adquirir genomas completos. É o caso de um estudo realizado por Li *et al.*, 2021 onde foi testado o método da Oxford Nanopore para o sequenciamento de isolados de *T. virens* e *atroviride*, é importante salientar que foi possível categorizar e verificar detalhes evolutivos de genomas nucleares e mitocondriais de *Trichoderma* spp. e realizar a anotação dos genes, somente utilizando a tecnologia Nanopore e com uma extração de DNA eficiente. É comum também encontrar outros estudos onde se combinam duas técnicas de sequenciamento para reduzir a taxa de erro no sequenciamento de moléculas longas. É o caso do anúncio do genoma completo de *T. gracile* (HK011-1) onde foi utilizada a tecnologia Nanopore e a plataforma Miseq (Illumina) para realizar o sequenciamento completo do genoma, a relação filogenética com outras espécies e a anotação dos genes (LI e LIU, 2022).

No caso deste estudo, foi possível combinar as duas técnicas e obter o sequenciamento completo dos genomas dos fungos, todavia há uma esteira de processos que deve ser seguida após a obtenção dos dados do genoma. Essas análises possuem o papel de

testar e encontrar possíveis erros, corrigi-los e garantir que a anotação dos genes resultará na maior qualidade possível. As montagens obtidas com os dados de sequenciamento Nanopore foram alinhadas às sequências Illumina com o programa BWA-MEM e polidas com o programa Pilon, que tem como função principal a correção de possíveis erros no sequenciamento, realizando inclusões e exclusões nas sequências de múltiplos tamanhos.

Estratégia de montagem híbrida semelhante foi utilizada para a obtenção dos genomas completos de três isolados de *T. koningiopsis* capazes de controlar a doença da morte do mamão, causada pela bactéria *Erwinia mallotivora*. Foram identificados genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários bioativos, potencialmente responsáveis pelo controle da doença observado (TAMIZI *et al.*, 2022).

Após a correção de possíveis erros de sequenciamento, é necessário medir a qualidade da montagem do genoma, neste estudo os dados foram processados pelo software BUSCO. O script do BUSCO possui uma lógica simples, é realizada uma comparação entre a matriz de dados do sequenciamento com o banco de dados acessado pelo software, desta forma são mensurados alguns parâmetros de qualidade, medidos através da seleção do código genético mais provável com base em qual código produz a maior densidade de codificação. No presente estudo, a análise de BUSCO mostrou genomas quase completos com presença de 94,6% (isolado 30/07) e 95,8% (isolado 19/17) dos genes conservados da família Hypocreales. Para comparação, a mesma análise realizada com dados do genoma completo de *T. simmonsii*, obtido com uma cobertura de sequenciamento de 374x (CHUNG *et al.*, 2021), encontrou 99,2% dos genes conservados de Hypocreales.

A previsão das funções dos genes para cada um dos isolados de *Trichoderma* foi realizada através do software Funannotate, que mostrou conteúdo gênico similar entre os dois isolados (Figuras 15 e 16). Nesta análise, podemos observar que a classificação que apareceu com maior frequência foi a de função desconhecida, seguida da modificação pós-traducional, biossíntese de metabólitos secundários, transporte e metabolismo de aminoácidos e tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular. Entre estas características, a produção de metabólitos secundários está intimamente ligada aos mecanismos de antagonismo destes agentes de controle biológico. Nesta categoria de síntese de metabólitos secundários, estão presentes as policetídeo sintases e os peptídeos não-ribossomais sintetases (Figuras 19 e 20) que estão ligados a características de promoção de crescimento, antibiose, indução de resistência e produção de antibióticos, principalmente

associados a compostos voláteis e não voláteis (TYŚKIEWICZ *et al.*, 2022; YAO *et al.*, 2016). A presença desses genes explica, ainda que parcialmente, a eficácia dos dois isolados utilizados neste estudo e nos demais experimentos realizados pelo grupo da ULRBMA como agentes de controle biológico de doenças.

Outra característica importante observada na anotação dos genomas dos isolados de *Trichoderma* spp., são genes que codificam a produção das CAZymes (Figura 17 e 18). As enzimas ativas em carboidratos desempenham um papel importante na atuação dessas espécies de fungos como decompositores de biomassa. Foram encontradas mais de 200 glicosil hidrolases em cada isolado. Tal característica classifica estes fungos como importantes na produção de biocombustíveis, linha investigativa pouco explorada quando se trata da utilização de *Trichoderma* fora da produção agrícola (FERREIRA FILHO *et al.*, 2017; ROSOLEN *et al.*, 2022). A anotação dos genes envolvidos na biologia destes isolados é um conjunto de informações importantes que abre margem pra diversas linhas investigativas, o que torna necessária, inicialmente, uma comparação entre genomas completos de espécies de *Trichoderma* spp já disponibilizados em bancos de dados públicos.

## 12 CONCLUSÕES

Os métodos extração de DNA demonstraram serem partes essenciais nos trabalhos de sequenciamento de DNA, onde se utiliza tecnologia de sequenciamento direto. O método CTAB demonstrou que se pode obter amostras mais puras e concentradas que acarreta maior eficiências para o sequenciamento.

A combinação do sequenciamento híbrido (Nanopore e Miseq) foi eficaz na obtenção do genoma completo dos isolados de *Trichoderma* spp, onde as sequências de menor tamanho (Illumina), mantiveram a qualidade do genoma, corrigindo possíveis erros do sequenciamento de moléculas longas (MinION).

As análises pós sequenciamento foram capazes de atestar a qualidade do genoma, as características genéticas encontradas após a anotação dos genes, caracterizam de forma geral os atributos de eficácia para um agente de controle biológico em relação aos isolados de *Trichoderma*.

## REFERÊNCIAS

- ABOUL-MAATY, N. A.-F.; ORABY, H. A.-S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, p. 1–10, 2019.
- ANTONIOLLI, Z. I.; KAMINSKI, J. **Antoniolli e Kaminski, 1991..pdfCiência Rural**, 1992.
- ANZANELLO, R.; TEDESCO, A. BOLETIM TÉCNICO : pesquisa e desenvolvimento. 2020.
- ARAUJO FROTA, M. T. B.; SIQUEIRA, C. E. Pesticides: The hidden poisons on our table. **Cadernos de Saude Publica**, v. 37, n. 2, p. 1–5, 2021.
- ARRIEL-ELIAS, M. T. *et al.* Induction of resistance in rice plants using bioproducts produced from *Burkholderia pyrrocinia* BRM 32113. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 19, p. 19705–19718, 2019.
- ATANASOVA, L. *et al.* Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.
- B. LALRUATFELA, P.B. LALTHANPUII, C. L. AND K. L. Co py li ne ne Co py. v. 41, n. July, p. 840–844, 2020.
- BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 106–136, 2013.
- BARBOSA, J. Z. *et al.* Bactérias e fungos benéficos na endosfera das plantas. **Revista Agrogeoambiental**, v. 7, n. 3, 2014.
- BARONCELLI, R. *et al.* Draft whole-genome sequence of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T6776. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. 9–10, 2015.
- \_\_\_\_\_. Draft whole-genome sequence of *Trichoderma gamsii* T6085, a promising biocontrol agent of Fusarium head blight on wheat. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, p. 7–8, 2016.
- BARROS, G. S. C. O Agronegócio, a pandemia e a economia mundial. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea)**, p. 1–6, 2020.
- BENSON, D. R.; SILVESTER, W. B. Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts

of actinorhizal plants. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 2, p. 293–319, 1993.

BETTIOL, W. *et al.* Produtos comerciais à base de *Trichoderma*. **Trichoderma: uso na agricultura**, p. 536, 2019.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2647–2653, 1997.

BOWDEN, R. *et al.* Sequencing of human genomes with nanopore technology. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2019.

BRAUN, H. *et al.* *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 280, p. 10–16, 2018.

BROTMAN, Y. *et al.* Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 779–789, 2008.

CABRAL, C. M. *et al.* Como a Riqueza Dos Microrganismos Presentes No Solo Rizosférico Serão Ou Irão Influenciar a Fitorremediação? **Revista Vozes dos Vales**, n. 16, p. 1–15, 2019.

CANTALAPIEDRA, C. P. *et al.* eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 12, p. 5825–5829, 2021.

CARDOZA, R. E.; MALMIERCA, M. G.; GUTIÉRREZ, S. Overexpression of *erg1* gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413: effect on the induction of tomato defence-related genes. **Journal of applied microbiology**, v. 117, n. 3, p. 812–823, 2014.

CAREW, M. E. *et al.* Environmental monitoring using next generation sequencing: Rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. **Frontiers in Zoology**, v. 10, n. 1, 2013.

CARVALHO, D. B. DE; CARVALHO, R. I. N. DE. Qualidade fisiológica de sementes de guanxuma sob influência do envelhecimento acelerado e da luz. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 489–494, 2009.

CARVALHO FILHO, M. R. *et al.* Avaliação De Isolados De *Trichoderma* No Controle De Mancha Foliar Do Eucalipto in Vitro E Quanto a Esporulação Em Dois Substratos Sólidos. **Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia**, 2008.

CASTRILLO. crossm First Whole-Genome Shotgun Sequence of a Promising Cellulase Secretor ,. v. 5, n. 37, p. 36–37, [s.d.].

CHANDRIKA, K. S. V. P.; PRASAD, R. D.; GODBOLE, V. Development of chitosan-PEG blended films using *Trichoderma*: Enhancement of antimicrobial activity and seed quality. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 282–290, 2019.

CHAVERRI, P. *et al.* Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. **Mycologia**, v. 107, n. 3, p. 558–590, 2016.

CHUNG, D.; KWON, Y. M.; YANG, Y. Telomere-to-telomere genome assembly of asparaginase-producing *Trichoderma simmonsii*. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1–18, 2021.

CONINCK, E. *et al.* *Trichoderma atroviride* as a promising biocontrol agent in seed coating for reducing Fusarium damping-off on maize. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 637–651, 2020.

CORABI-ADELL, C. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* (Hypocreales - fungi) mediante técnicas moleculares e análise ecofisiográfica. **Aleph**, p. xviii, 202 f. : il., gráfs., tabs.fots., 2005.

CRISTALDI, A. *et al.* Phytoremediation potential of *Arundo donax* (Giant Reed) in contaminated soil by heavy metals. **Environmental Research**, v. 185, n. March, 2020.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P. DE; NOGUEIRA, B. Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera Las interacciones entre los grupos de microorganismos en la rizosfera. v. 6325, p. 213–218, 1984.

DIXIT, P. *et al.* Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

DNK, I. S. THE HISTORY OF DNA SEQUENCING. v. 32, n. 4, p. 301–312, 2014.

DORIGHELLO, D. V. *et al.* Controlling Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) with *Bacillus* spp. and coffee oil. **Crop Protection**, v. 67, p. 59–65, 2015.

DRUZHININA, I. S. *et al.* Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. [s.l: s.n.]. v. 14

DRUZHININA, I. S.; SHELEST, E.; KUBICEK, C. P. Novel traits of *Trichoderma* predicted through the analysis of its secretome. **FEMS Microbiology Letters**, v. 337, n. 1, p. 1–9, 2012.

EL-MOHAMEDY, R. S. R. Efficiency of different application methods of biocontrol agents and biocides in control of Fusarium root rot on some citrus rootstocks. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 42, n. 9, p. 819–828, 2009.

ELSHARKAWY, M. M.; EL-KHATEEB, N. M. M. Antifungal activity and resistance induction against *Sclerotium cepivorum* by plant growth-promoting fungi in onion plants. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 1, 2019.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790–2798, 2001.

EUGENIA, M. D. *et al.* The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 8, p. 1021–1031, 2009.

EXIME, E. *et al.* Agricultura familiar e desenvolvimento sustentável: uma caracterização da feira do produtor rural do município de Marechal Cândido Rondon – Paraná, Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e20310111462, 2021.

FANELLI, F. *et al.* Genomic characterization of *Trichoderma atrobrunneum* (*T. harzianum* species complex) ITEM 908: insight into the genetic endowment of a multi-target biocontrol strain. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 662, 2018.

FERREIRA FILHO, J. A. *et al.* Carbohydrate-active enzymes in *Trichoderma harzianum*: A bioinformatic analysis bioprospecting for key enzymes for the biofuels industry. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.

FERREIRA, M. G. DA C. *et al.* Glyceolin and phaseolin induction in soybean and beans as a function of biocontrol agents application. **Cientific@ - Multidisciplinary Journal**, v. 6, n. 1, p. 113–118, 2019.

- FONTENELLE, A. D. B. *et al.* Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 30, n. 11, p. 1492–1500, 2011.
- FORTES, F. D. O. *et al.* Root induction from microcutting of an *Eucalyptus* sp. clone by *Trichoderma* spp. **Revista Arvore**, v. 31, n. 2, p. 221–228, 2007.
- FOSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. v. 10, n. 5, p. 140–148, 1945.
- FUJINAWA, M. F. *et al.* Biological control of gray mold and Myrothecium leaf spot in begonias. **Crop Protection**, v. 133, n. March, p. 105138, 2020.
- GARBEVA, P.; VEEN, J. A. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 29, p. 243–270, 2004.
- GIORDANO, F. *et al.* De novo yeast genome assemblies from MinION, PacBio and MiSeq platforms. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- GOLDSTEIN, S. *et al.* Evaluation of strategies for the assembly of diverse bacterial genomes using MinION long-read sequencing. **bioRxiv**, p. 362673, 2018.
- GOMES, E. V. *et al.* The Cerato-Platanin protein Epl-1 from *Trichoderma harzianum* is involved in mycoparasitism, plant resistance induction and self cell wall protection. **Scientific Reports**, v. 5, n. December, p. 1–13, 2015.
- GORTIKOV, M. *et al.* Sequencing and Analysis of the Entire Genome of the Mycoparasitic Bioeffector Fungus *Trichoderma asperelloides* Strain T 203 (Hypocreales). **Microbiology Resource Announcements**, v. 11, n. 2, p. 12–14, 2022.
- GRASS, I. *et al.* Trade-offs between multifunctionality and profit in tropical smallholder landscapes. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.
- GUZMÁN-GUZMÁN, P. *et al.* Identification of effector-like proteins in *Trichoderma* spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. **BMC Genetics**, v. 18, n. 1, p. 1–20, 2017.
- HADDAD, P. E. *et al.* Selection of *Trichoderma* spp. strains for the control of sclerotiorum in soybean. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 52, n. 12, p. 1140–1148, 2017.
- HAHNE, H. *et al.* A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus*

*subtilis* salt stress adaptation. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 3, p. 870–882, 2010.

HARMAN, G. E. *et al.* Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 147–153, 2004.

\_\_\_\_\_. Comparison of Chemical Control, Contact Biological, and Endophytic Control Systems. **Plant Disease**, v. 94, n. 8, 2010.

HARRISON, N.; KIDNER, C. A. Next-generation sequencing and systematics: What can a billion base pairs of DNA sequence data do for you? **Taxon**, v. 60, n. 6, p. 1552–1566, 2011.

HASAN, Z. A. E. *et al.* Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum*-enriched coconut fibre against Fusarium wilts of cherry tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 991–1003, 2020.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The Sequence of Sequencers : The History of SC. **Genomics**, 2015.

HEREDIA, B.; PALMEIRA, M.; LEITE, S. P. Sociedade e economia do “agronegócio” no brasil. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 25, n. 74, p. 159–176, 2010.

HERMOSA, R. *et al.* The overexpression in *Arabidopsis thaliana* of a *Trichoderma harzianum* gene that modulates glucosidase activity, and enhances tolerance to salt and osmotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1295–1302, 2011.

HETHERINGTON, A. J.; DOLAN, L. Stepwise and independent origins of roots among land plants. **Nature**, v. 561, n. 7722, p. 235–238, 2018.

HOFFMANN, T. *et al.* High-salinity-induced iron limitation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 718–727, 2002.

HUANG, X. *et al.* CTAB-PEG DNA Extraction from Fungi with High Contents of Polysaccharides. **Molecular Biology**, v. 52, n. 4, p. 621–628, 2018.

IBGE. Censo agropecuário 2017: resultados definitivos. **Censo agropecuário**, v. 8, p. 93, 2019.

IKRAM, M. *et al.* *Trichoderma reesei* improved the nutrition status of wheat crop under salt stress. **Journal of Plant Interactions**, v. 14, n. 1, p. 590–602, 2019.

J.T., P. S.; OJ., K.; M.V, T. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

- JAGADEESAN, B. *et al.* The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. **Food Microbiology**, v. 79, n. June 2018, p. 96–115, 2019.
- JANET I. SPRENT, J. A. AND E. K. J. Tansley review Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen- fixing symbionts Author for correspondence : p. 52, 2016.
- JANTO, B. *et al.* NIH Public Access. v. 13, n. 12, p. 3289–3309, 2012.
- JASNY, B. R.; ZAHN, L. M. Genome-sequencing anniversary. A celebration of the genome, part I. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6017, p. 546, 2011.
- JOHNSON, J. AND HOGGAN, I. A. The Inactivation of ordinary *tobacco mosaic virus* by microorganisms. **Phytopathology**, v. 27, p. 1014–1027, 1937.
- JONES, A. *et al.* High-molecular weight DNA extraction from challenging fungi using CTAB and gel purification V . 2. p. 4–5, 2019.
- KAPPEL, L. *et al.* **Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and Trichoderma biocontrol**. [s.l: s.n.]. v. 16
- KCHOUK, M.; GIBRAT, J. F.; ELLOUMI, M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. **Biology and Medicine**, v. 09, n. 03, 2017.
- KIM, Y. G. *et al.* Antagonistic Activities of Novel Peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10380–10387, 2015.
- KITADA, M. *et al.* Properties of two different Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport systems in alkaliphilic *Bacillus sp.* strain C-125. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 21, p. 6464–6469, 1994.
- KOBIERSKI, M. *et al.* The Effect of Organic and Conventional Farming Systems with Different Tillage on Soil Properties and Enzymatic Activity. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1809, 2020.
- KOLMOGOROV, M. *et al.* Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 540–546, 2019.
- KUBICEK, C. P. *et al.* Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, v. 12, n. 4, 2011.
- \_\_\_\_\_. Evolution and comparative genomics of the most common *Trichoderma species*. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–24, 2019.

KULSKI, J. K. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. 32, p. 137–144, 2015.

KUO, H. C. *et al.* Genome sequence of *Trichoderma virens* FT-333 from tropical marine climate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 7, p. 2003–2006, 2015.

LADI, E. *et al.* Copper tolerant *Trichoderma asperellum* increases bio-efficacy of copper against *Phytophthora infestans* in dual combination. **Phytoparasitica**, v. 48, n. 3, p. 357–370, 2020.

LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 187–197, 2011.

LANNA-FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. DE. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12–20, 2010.

LEE, S. *et al.* Volatile organic compounds emitted by trichoderma species mediate plant growth. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2016.

LI, H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. v. 00, n. 00, p. 1–3, 2013.

LI, M. F.; LI, G. H.; ZHANG, K. Q. Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. **Metabolites**, v. 9, n. 3, 2019.

LI, W.-C. *et al.* Complete Genome Sequences and Genome-Wide Characterization of *Trichoderma* Biocontrol Agents Provide New Insights into their Evolution and Variation in Genome Organization, Sexual Development, and Fungal-Plant Interactions . **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. 1–17, 2021.

LI, Z.; LIU, T. The Highly Contiguous Genome Resource of *Trichoderma semiorbis* FJ059, a Biological Control Agent for Litchi Downy Blight . **Phytopathology®**, v. 112, n. 6, p. 1391–1395, 2022a.

\_\_\_\_\_. High-Quality Genome Sequence Data of *Trichoderma gracile* HK011-1, a Fungal Antagonistic Agent Against Plant Pathogens . **Plant Disease**, v. 106, n. 3, p. 1035–1038, 2022b.

LIU, B. *et al.* Isolation of *Trichoderma* in the rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. **Microbiological Research**, v. 235, n. February, p. 126445, 2020.

- LIU, L. *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- LORITO, M. *et al.* Translational research on *Trichoderma*: From 'omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 395–417, 2010.
- LUCON, C. M. M. *et al.* Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 225–232, 2009.
- MACENA, A. M. F. *et al.* Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. **BioControl**, v. 65, n. 2, p. 235–246, 2020.
- MACHADO, D. F. M. *et al.* *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Arvore**, v. 39, n. 1, p. 167–176, 2015.
- MALIA, H. A. *et al.* Avaliação agronômica de variedades de tomate. **Horticultura em Moçambique: Características, Tecnologias de Produção e de Pós-Colheita**, p. 193–200, 2015.
- MANGANIELLO, G. *et al.* Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, 2018.
- MANNI, M. *et al.* BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 10, p. 4647–4654, 2021.
- MARGULIES, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–380, 2005.
- MARTINEZ, D. *et al.* Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–560, 2008.
- MCCARTHY, A. Third generation DNA sequencing: Pacific biosciences' single molecule real time technology. **Chemistry and Biology**, v. 17, n. 7, p. 675–676, 2010.
- MEHMETOGLU, O.; POPOV, B. Maximum principle and convergence of central schemes based on slope limiters. **Mathematics of Computation**, v. 81, n. 277, p. 219–

231, 2012.

MELEHA, A. M. I. *et al.* Effect of Planting Dates and Planting Methods on Water Relations of Wheat. **International Journal of Agronomy**, v. 2020, 2020.

MICHEREFF, A. E. M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. [s.l: s.n.].

MORAES, R. F. DE. Agrotóxicos no Brasil : padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. **Ipea**, p. 76, 2019.

MORALES-CEDENO, L. R. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, 2021.

MPANGA, I. K. *et al.* The form of n supply determines plant growth promotion by p-solubilizing microorganisms in maize. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, 2019.

MUKHERJEE, M.; MUKHERJEE, P. K.; KALE, S. P. CAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1734–1742, 2007.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Role of Two G-Protein Alpha Subunits, TgaA and TgaB, in the Antagonism of Plant Pathogens by *Trichoderma virens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 542–549, 2004.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 19, p. 4321–4326, 1980.

NOGUEIRA, V. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E PROTEÇÃO SISTÊMICA EM PEPINEIRO A *Colletotrichum lagenarium* POR *Trichoderma spp.* p. 102, 2011.

OSZUST, K.; CYBULSKA, J.; FRĄC, M. How do *Trichoderma* genus fungi win a nutritional competition battle against soft fruit pathogens? A report on niche overlap nutritional potentiates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1–19, 2020.

PALMA, M. DE *et al.* Transcriptome reprogramming, epigenetic modifications and alternative splicing orchestrate the tomato root response to the beneficial fungus *Trichoderma harzianum*. **Horticulture Research**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2019.

PALMER, J. M.; STAJICH, J. annotation. p. 5–6, 2022.

PANDEY, A. *et al.* Cold Adapted Fungi from Indian Himalaya: Untapped Source for

Bioprospecting. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences**, v. 89, n. 4, p. 1125–1132, 2019.

PAWLOWSKI, K.; DEMCHENKO, K. N. The diversity of actinorhizal symbiosis. **Protoplasma**, v. 249, n. 4, p. 967–979, 2012.

POZO, M. J. *et al.* Functional analysis of *tvsp1*, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 3, p. 336–348, 2004.

PRAVETTONI, G. **P5 eHealth: An Agenda for the Health Technologies of the Future**. [s.l: s.n.].

PROCTOR, R. H. *et al.* **Evolution of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi**. [s.l: s.n.]. v. 14

PURUSHOTHAM, N. *et al.* Draft Genome Resource for *Macrophomina phaseolina* Associated with Charcoal Rot in Sorghum. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 33, n. 5, p. 724–726, 2020.

RHOADS, A.; AU, K. F. PacBio Sequencing and Its Applications. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 278–289, 2015.

ROLIM, J. M. *et al.* Antagonism and effect of volatile metabolites of *Trichoderma* spp. on *Cladosporium* spp. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, 2019.

RON, M.; AVNI, A. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. **Plant Cell**, v. 16, n. 6, p. 1604–1615, 2004.

ROSOLEN, R. R. *et al.* Network Analysis Reveals Different Cellulose Degradation Strategies Across *Trichoderma harzianum* Strains Associated With XYR1 and CRE1. **Frontiers in Genetics**, v. 13, n. February, p. 1–19, 2022.

RUBIO, M. B. *et al.* Comparative study of *Trichoderma* gene expression in interactions with tomato plants using highdensity oligonucleotide microarrays. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 119–128, 2012.

RUOCCO, M. *et al.* Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: The role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 3, p. 291–301, 2009.

S.M NASH, W. C. S. This Week ' s Citation Classic ® sE ~. **Psychometric theory**, v. 13,

n. 48, p. 1991, 1991.

SAIPRASAD, G. V. S. *et al.* Development of *Trichoderma harzianum* endochitinase gene construct conferring antifungal activity in transgenic tobacco. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 199–206, 2009.

SAMOLSKI, I. *et al.* The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 129–138, 2012.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v. 100, n. 8, p. 923–935, 1996.

SÁNCHEZ-MONTESINOS, B. *et al.* Plant growth promotion and biocontrol of *Pythium ultimum* by saline tolerant trichoderma isolates under salinity stress. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 11, p. 1–11, 2019.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. . DNA sequencing with chain-terminating. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SCHMOLL, M. *et al.* The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 205–327, 2016.

SHASMITA *et al.* Comparative analysis of different biotic and abiotic agents for growth promotion in rice (*Oryza sativa* L.) and their effect on induction of resistance against *Rhizoctonia solani*: A soil borne pathogen. **Biological Control**, v. 133, n. September 2018, p. 123–133, 2019.

SILVA, E. M. DA *et al.* Eficiência De Rizóbios Sob Doses De Fósforo Na Cultura Do Feijão-Caupi. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 9, n. 2, p. 67–77, 2019.

SILVA, R. N. *et al.* *Trichoderma*/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. **Fungal Biology**, v. 123, n. 8, p. 565–583, 2019.

SILVA, V. N. DA *et al.* Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 12, p. 1609–1618, 2011.

SINGH, P. *et al.* Seed biopriming with antagonistic microbes and ascorbic acid induce resistance in tomato against Fusarium wilt. **Microbiological Research**, v. 237, n. April, p. 126482, 2020.

- SINGH, V. *et al.* Isolation and screening of high salinity tolerant *Trichoderma* spp. with plant growth property and antagonistic activity against various soilborne phytopathogens. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 52, n. 7–8, p. 667–680, 2019.
- SOARES, A. L. DE L. *et al.* Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): II - feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 803–811, 2006.
- SOLIMAN, T. *et al.* Profiling soil microbial communities with next-generation sequencing: The influence of DNA kit selection and technician technical expertise. **PeerJ**, v. 2017, n. 12, p. 1–16, 2017.
- SOUTO, P. C. *et al.* Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 151–160, 2008.
- SOUZA, A. K. R.; MORASSUTI, C. Y.; DEUS, W. B. DE. Poluição Do Ambiente Por Metais Pesados E Utilização De Vegetais Como Bioindicadores. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 9, n. 3, p. 95, 2018.
- SOUZA PEDRO, E. A. DE *et al.* Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1589–1595, 2012.
- SPECKBACHER, V. *et al.* The Lipoyxygenase Lox1 Is Involved in Light- and Injury-Response, Conidiation, and Volatile Organic Compound Biosynthesis in the Mycoparasitic Fungus *Trichoderma atroviride*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. August, 2020.
- SRIVASTAVA, M.; SHAHID, M. *Trichoderma* Genome to Genomics: A Review. **Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics**, v. 05, n. 03, p. 3–6, 2014.
- STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. tritici. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25–34, 2000.
- STUDHOLME, D. J. *et al.* Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture-insights from genomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. JUL, p. 1–13, 2013.
- SUHENDRA, A. D.; ASWOROWATI, R. D.; ISMAWATI, T. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. **Akrab**

**Juara**, v. 5, n. 1, p. 43–54, 2020.

TAMIZI, A. A. *et al.* Genome Sequencing and Analysis of *Trichoderma* (Hypocreaceae) Isolates Exhibiting Antagonistic Activity against the Papaya Dieback Pathogen, *Erwinia mallotivora*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 3, 2022.

TAN, M. H. *et al.* Finding Nemo: Hybrid assembly with Oxford Nanopore and Illumina reads greatly improves the clownfish (*Amphiprion ocellaris*) genome assembly. **GigaScience**, v. 7, n. 3, p. 1–6, 2018.

THOMPSON, J. F.; MILOS, P. M. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. **Genome Biology**, v. 12, n. 2, 2011.

TIJERINO, A. *et al.* Overexpression of the *Trichoderma brevicompactum* tri5 gene: Effect on the expression of the *Trichoderma* biosynthetic genes and on tomato seedlings. **Toxins**, v. 3, n. 9, p. 1220–1232, 2011.

TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* F.sp. *lycopersici* (Wr) Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 23, n. 0, p. 195–209, 1966.

TUCCI, M. *et al.* The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 341–354, 2011.

TYLER, A. D. *et al.* Evaluation of Oxford Nanopore's MinION Sequencing Device for Microbial Whole Genome Sequencing Applications. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

TYŚKIEWICZ, R. *et al.* *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, 2022.

UMESHA, S.; MANUKUMAR, H. M.; RAGHAVA, S. A rapid method for isolation of genomic DNA from food-borne fungal pathogens. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2016.

VAILLANCOURT, B.; BUELL, C. R. High molecular weight DNA isolation method from diverse plant species for use with Oxford Nanopore sequencing. p. 1–13, 2019.

VENICE, F. *et al.* Genome sequence of *trichoderma lixii* mut3171, a promising strain for mycoremediation of pah-contaminated sites. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–15, 2020.

VILANOVA, S. *et al.* SILEX: A fast and inexpensive high-quality DNA extraction method suitable for multiple sequencing platforms and recalcitrant plant species. **Plant**

**Methods**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2020.

WALKER, B. J. *et al.* Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

WANG, J. *et al.* Conversion of rainforest into agroforestry and monoculture plantation in China: Consequences for soil phosphorus forms and microbial community. **Science of the Total Environment**, v. 595, p. 769–778, 2017.

WAQUIL, J. M. Manejo integrado de pragas: revisão história e perspectivas. **Manejo Integrado de Pragas**, p. 1- 16. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa>, 2002.

WATTS, G. Frederick Sanger. **The Lancet**, v. 382, n. 9908, p. 1872, 2013.

XIE, B. BIN *et al.* Comparative genomics provide insights into evolution of *Trichoderma* nutrition style. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 379–390, 2014.

XIONG, J. *et al.* Systemic nematicidal activity and biocontrol efficacy of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 661–667, 2015.

YAGHOUBIAN, Y. *et al.* Bio-removal of cadmium from aqueous solutions by filamentous fungi: *Trichoderma* spp. and *Piriformospora indica*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7863–7872, 2019.

YANG, D. *et al.* Genome sequence and annotation of *Trichoderma parareesei*, the ancestor of the cellulase producer *Trichoderma reesei*. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, p. 2015, 2015.

YAO, L. *et al.* Isolation and expression of two polyketide synthase genes from *Trichoderma harzianum* 88 during mycoparasitism. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 468–479, 2016.

YU, C. *et al.* Elicitor hydrophobin Hyd1 interacts with Ubiquilin1-like to induce maize systemic resistance. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 62, n. 4, p. 509–526, 2020.

ZHANG, Y.; ZHUANG, W. Y. *Trichoderma brevicrassum* strain TC967 with capacities of diminishing cucumber disease caused by *Rhizoctonia solani* and promoting plant growth. **Biological Control**, v. 142, p. 104151, 2020.

ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 335–337, 2010.

ZIPFEL, C.; OLDROYD, G. E. D. Plant signalling in symbiosis and immunity. **Nature**, v. 543, n. 7645, p. 328–336, 2017.

